

**T.C.**  
**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**FERMENTASYON VE ENZİMATİK HİDROLİZ UYGULANAN PEYNİR ALTI  
SUYUNUN BAZI BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Atila TAŞ**

**AĞUSTOS 2019**

**UŞAK**

**T.C**  
**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**FERMENTASYON VE ENZİMATİK HİDROLİZ UYGULANAN PEYNİR ALTI**  
**SUYUNUN BAZI BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Atilla TAŞ**

**UŞAK 2019**

Atilla TAŞ tarafından hazırlanan “*Fermentasyon ve Enzimatik Hidroliz Uygulanan Peynir Altı Suyunun Bazı Biyoaktif Özelliklerinin İncelenmesi*” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Onur GÜNEŞER .....

Tez Danışmanı, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Onur GÜNEŞER .....

(Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Dr. Öğr. Üyesi Özgür TARHAN .....

(Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Doç.Dr. Müge İŞLETEN HOŞOĞLU .....

(Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Gebze Teknik Üniversitesi)

Tarih: 07/08/2019

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Murat Kemal KARACAN .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

Atilla TAŞ

# FERMENTASYON VE ENZİMATİK HİDROLİZ UYGULANAN PEYNİR ALTI SUYUNUN BAZI BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Atilla TAŞ

UŞAK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2019

## ÖZET

Bu çalışmada, peynir altı suyunun hem farklı tür probiyotik mikroorganizmalarla fermente edilerek, hem de çeşitli bitkisel proteaz enzimleri ile hidroliz edilerek biyoaktif peptitler yönünden zenginleştirilmiş peynir altı suyu tozu üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; peynir altı suyu örnekleri hem probiyotik bakterilerle (*Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus*) fermente edilmiş, hem de ananas, kavun ve enginar kabuklarından elde edilen bitkisel ham enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilmiştir. Fermente ve hidroliz edilmiş peynir altı suları'nın fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve biyoaktif özellikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, ananas, kavun ve enginar kabuklarından elde edilen ham enzim ekstraktlarının proteolitik enzim aktiviteleri sırasıyla 5,066, 4,921 ve 5,514 UI/mL olarak belirlenmiştir. Fermente edilen peynir altı suyu örneklerinde yapılan *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* sayımında sırasıyla 0,39 log kob/mL ve 1,09 log kob/mL düzeyinde bir artışın olduğu belirlenmiştir. Bitkisel ham enzim ekstraktlarıyla hidrolize olan peynir altı suyu örneklerinde %35 ile %53 arasında değişen antioksidan aktivite artışının meydana geldiği tespit edilmiştir. *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* ile fermente edilen peynir altı sularının EC<sub>50</sub> değerinin sırasıyla 980,93 µL ve 1567,63 µL olduğu belirlenmiştir. Fermente edilen peynir altı suyu örneklerinin anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitör aktiviteleri 2,02-6,48 kat arasında artarken, bu inhibitör aktivite değeri hidroliz edilen peynir altı suyu örneklerinde 1,85 ile 3,29 kat arasında artış göstermiştir. Fermente ve hidrolize edilmiş peynir altı suları'nın *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* bakterileri üzerine herhangi bir mikrobiyel inhibisyon sağlamadığı da tespit edilmiştir. Elektroforetik

analizler sonucunda;  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin'in hidroliz ve fermentasyon sonucunda parçalanmalarının farklı düzeyde gerçekteştiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** peynir altı suyu, biyoaktif peptitler, fermentasyon, hidroliz

**Sayfa Adedi:** 76

**Tez Yöneticisi:** Doç. Dr. Onur GÜNEŞER



**INVESTIGATION OF SOME BIOACTIVE PROPERTIES OF WHEY APPLIED  
FERMENTATION AND ENZYMATIC HYDROLYSIS  
(M.Sc. Thesis)**

**Atila TAŞ**

**UNIVERSITY OF UŞAK**

**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**August 2019**

**ABSTRACT**

In this study, it was aimed to produce whey enriched with bioactive peptides by both fermentation of probiotic microorganism and hydrolization of certain plant protease extract. For this purpose, whey was both fermented by probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactabacillus rhamnosus*) and hydrolized the raw enzyme extracts obtained from the peels of pineapple, watermelon and artichoke. Physico-chemical, microbiological and bioactive properties of fermented and hdyrolized whey were investigated. As a result, proteolytic activities of raw enzyme extracts obtained from the peels of pineapple, watermelon and artichoke were determined as 5.066, 4.921 ve 5.514 UI/mL, respectively. An increase in cell of *L. acidophilus* and *L. rhamnosus* in fermented whey samples were found as 0.39 log cfu/mL and 1.09 log cfu/mL, respectively. It was determined that an increase from 35 to 53 % in antioxidant activitiy of whey samples hydrolized by the raw enzyme extracts. It was determined that EC<sub>50</sub> values of whey fermented by *L. acidophilus* and *L. rhamnosus* were 980,93 µL and 1567,63 µL respectively. Angiotensin converting enzyme inhibitor activities of fermented whey samples increased between 2.02 and 6.48 fold, while this inhibitor activity values in whey samples hydrolized the raw enzyme extracts increased between 1.85 and 3.29 fold. It was determined that fermented and hydrolized whey sample had no antimicrobial activity on *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*. As a result of electrophoretic analysis, it was determined that the degredations of β-lactoglobulin and α-lactalbumin were occurred by hydrolysis and fermentation at the different levels.

**Key Words:** whey, bioactive peptides, fermentation, hydrolyses

**Page Number:** 76

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr. Onur GÜNEŞER

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileriyle beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Onur GÜNEŞER'e

Elektroforetik analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan hocam Dr. Öğr. Üyesi Özgür TARHAN'a

Çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Buket Aydeniz GÜNEŞER'e,

CUPRAC analizlerinin yapılmasında kimyasal temininde desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç Dr. Çiğdem UYSAL PALA'ya

Laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan öğrenci arkadaşlarım ve meslektaşlarım olan Sevin KAYA ve Mustafa GÖZLER'e

Hammadde olarak kullandığım peynir altı suyu ve bazı kimyasal maddelerin temininde yardımcı olan Uşak Süt A. Ş'ye,

Çalışmamın genel bileşim analizlerinin gerçekleştirilmesinde laboratuvar olanaklarını bana sonuna kadar açan ve çalışma sonucunda elde ettiğim ürünlerimi kurutmam için bana pilot tesislerini kullanma izni veren Enka Süt A. Ş'nin üst yönetimine, teknik ekip ve tüm çalışanlarına,

Maddi ve manevi desteklerini hayatım boyunca hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan annem Nahide TAŞ'a, babam Hasan TAŞ'a, kız kardeşlerim Zeynep TAŞ SAYGILI ve Saniye TAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Atilla TAŞ

Uşak, 2019



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	viii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
2.1. Peynir Altı Suyu ve Genel Özellikleri .....	4
2.2. Peynir Altı Suyunun Kullanım Alanları .....	6
2.3. Süt Kaynaklı Biyoaktif Peptitler, Oluşumları ve İnsan Sağlığına Etkileri .....	8
2.4. Süt Sanayinde Bitkisel Enzimlerin Biyoaktif Peptit Üretiminde Kullanımı .....	13
2.5. Laktik Bakterilerinin Biyoaktif Peptit Üretiminde Kullanımı .....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	21
3.1. Materyal .....	21
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Peynir Altı Suyunun Pastörizasyonu.....	21
3.2.2. Peynir Altı Suyunun Probiyotik Bakteriler ile Fermentasyonu .....	21
3.2.3. Bitkisel Ham Enzim Ekstraktların Hazırlanması .....	21
3.2.4. Peynir Altı Suyunun Enzimatik Hidrolizi .....	23
3.2.5. Kimyasal Analizler.....	24
3.2.5.1. Genel Kompozisyon .....	24
3.2.5.2. İzole Edilen Ham Enzim Ekstraktlarında Preteolitik Aktivitenin Ölçülmesi .....	24
3.2.5.3. Jel Elektroforez Yöntemiyle Hidroliz Düzeyinin Belirlenmesi .....	24
3.2.6. Mikrobiyolojik Analizler.....	25
3.2.6.1. Probiyotik Bakterilerin Sayımı .....	25

3.2.7. Peynir Altı Suyunun Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	25
3.2.7.1. Antimikrobiyel Aktivite Tayini .....	25
3.2.7.2. Antioksidan Aktivite Tayini .....	26
3.2.7.3. Angiotensin-Converting Enzim (ACE) İnhibitör Aktivitesi Tayini .....	26
3.2.8. İstatistiksel Analizler.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	28
4.1.Genel Kompozisyon.....	28
4.2. Ham Enzim Ekstraktlarının Proteolitik Aktiviteleri .....	28
4.3. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularında Probiyotik Bakterilerin Gelişimleri... 29	
4.4. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının Antioksidan Aktiviteleri .....	30
4.5. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının ACE İnhibitör Aktiviteleri.....	34
4.6. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının Antimikrobiyel Aktiviteleri .....	39
4.7. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının SDS-PAGE Sonuçları.....	43
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	46
6. KAYNAKLAR.....	48
EKLER .....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	62

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tatlı ve ekşi peynir altı suyunun bileşimi .....	4
Çizelge 2.2. Süt ve süt ürünleri kaynaklı bazı biyoaktif peptitler .....	10
Çizelge 2.3. Süt proteinlerinin laktik asit bakterileriyle fermentasyonu sonucu oluşan bazı biyoaktif peptitler.....	19
Çizelge 4.1. Fermente ve hidrolize peynir altı sularının antioksidan aktiviteleri.....	31
Çizelge 4.2. Fermente ve hidrolize peynir altı sularının ACE inhibitör aktiviteleri.....	36
Çizelge 4.3. Fermente ve hidrolize peynir altı sularının antimikrobiyel aktiviteleri.. ..	40



## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Fermentasyon süresince probiyotik bakterilerin peynir altı suyundaki mikrobiyel gelişimleri.....	29
Şekil 4.2. Fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiş peynir altı suyunun elektroforez görüntüsü .....	43
Şekil 4.3. Hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş peynir altı suyunun elektroforez görüntüsü ....	44



## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 3.1. Plakalı ısı değiştirici .....	22
Resim 3.2. Aseptik şekilde 6 eşit parçalaya ayrılmış peynir altı suları .....	22
Resim 3.3. Ananas, Enginar ve Kavun kabukları ve ham ekstraktlar .....	23



## SİMGELER ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	Yüzde oran
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
°C	Santrigrat derece
®	Ticari ürün
w/w	Kütle/kütle oranı

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
CFU/KOB	Koloni oluşturan birim
dk	Dakika
DPPH	2,2-difenil-1- pikrilhidrazil
CUPRAC	Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite
FDA	Amerika Gıda ve İlaç İdaresi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
g	Gram
kcal	Kilo Kalori
kJ	Kilo Jolue
kg	Kilogram
mg	Miligram
$\mu$ g	Mikrogram
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
WPC/PSK	Peynir altı suyu protein konsantresi
WP/PST	Peynir altı suyu protein tozu
WPI/PSI	Peynir altı suyu protein izolatı

# 1. GİRİŞ

Günümüzde, insan metabolizması üzerinde birçok fizyolojik etkiye sahip biyolojik aktif bileşenlerin rolü giderek önem kazanmaktadır. Söz konusu bu biyoaktif bileşenlerin bir grubunu da gıda proteinlerinden ortaya çıkan biyoaktif peptitler (BAP) oluşturmaktadır. Hayvansal ve bitkisel proteinler potansiyel biyoaktif bileşenler içermelerine rağmen biyoaktif peptitler açısından en önemli kaynaklar süt ve süt ürünleridir. Süt kaynaklı biyoaktif peptitlerin büyük bir kısmı sütte bulunan kazein ve serum proteinlerinden oluşmaktadır. Farklı yollarla açığa çıkan süt kaynaklı biyoaktif peptitler, ilaç veya hormon benzeri bir aktivite gösterip, insan vücudunda fizyolojik tepkimelere cevap veren hedef hücre reseptörlerine bağlanmakta ve onlarla etkileşimde bulunmaktadırlar. Biyoaktif peptitlerin insan sağlığı üzerine; antihipertansif, antitrombik, opioid, antioksidatif ve antimikrobiyel, bağışıklık sistemini düzenleyici ve biyotayıyıcı etkileri bulunmaktadır (Chabance ve ark., 1998; Donagh ve ark., 1999; Korhonen and Pihlanto-Leppala, 2000; Meisel, 1997; Meisel, 1998; Meisel ve Bockelmann, 1999; Tirelli ve ark., 1997).

Süt proteinlerinden üretilmiş biyoaktif peptitlerin insan sağlığına pozitif etki eden birçok farklı fizyolojik biyoaktivitesi bulunmaktadır (Haque ve Chand, 2008; Preuffer ve Schrezenmeir, 2000). Süt proteinlerinin sahip olduğu biyoaktivite özelliklerinin çoğunlukla tek bileşen kaynaklı olduğu bilinmekle birlikte, söz konusu biyoaktivitelerin birden fazla bileşenin ortak etkisiyle de ortaya çıktığı bilinmektedir. Biyoaktif peptitlerin, bu özelliklerinde süt içerisinde bulunan diğer peptit ve peptit olmayan maddelerin de rolü bulunmaktadır. Diğer bir ifadeyle biyoaktivite, farklı bileşenlerin etkileşimi ile ortaya çıkan bir durumdur (Meisel, H. 1997). Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde önemli rol oynayan, biyoaktif peptitler, *in vivo* (gastrointestinal sindirim) ve *in vitro* (enzimatik yolla) yollarla oluşabilmektedir. Bunun yanı sıra, kimyasal olarak sentezlenen biyoaktif peptit zincirlerinin de olduğu bilinmektedir (Kınık ve Gürsoy, 2002).

Biyoaktif peptitlerin;

- a) mikrobiyal veya bitkisel kaynaklı enzim faaliyetleri,
- b) asit/baz hidrolizasyonu (kimyasal)
- c) proteolitik starter kültürlerin fermentasyonu sonucu oluşabildiği rapor edilmiştir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000).

Biyoaktif peptitlerin biyoyararlılığı ve insan metabolizmasındaki etkileri uzun süreden beri çalışılmakta olup üzerindeki tartışmalar halen devam etmektedir. Ayrıca, fonksiyonel gıdaların biyoaktif peptitlerle zenginleştirilmesi, bu peptitleri içeren fonksiyonel gıda ürünlerinin satışa sunulması veya farmakolojik preparatlarda kullanımlarıyla ilgili değişik yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu nedenle süttten veya peynir altı suyundan enzimatik hidrolizasyon (bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı) veya proteolitik aktiviteye sahip starter kültürlerin faaliyetleri sonucu üretilmesiyle elde edilen biyoaktif peptitler, katma değeri yüksek ürün elde etme açısından büyük bir potansiyel olarak görülmektedir (Korhonen ve Pihlanto, 2006; Korhonen, 2009).

Konu ile ilgili literatür tarandığında; süt ve süt ürünlerindeki biyoaktif peptitlerin insan metabolizmasındaki tripsin, kimotripsin gibi enzimlerle ortaya çıkarılmasının yoğun bir şekilde incelendiği görülmektedir (Haque ve Chand, 2008; Hernandez-Ledesma, 2007; Meisel ve Bockelmann, 1999). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda ise farklı tür hayvanların sütlerinin doğrudan kullanımıyla veya bu sütlerden elde edilen peynir altı sularının laktik asit bakterileri veya farklı enzimlerle muamelesi sonucunda üretilen biyoaktif peptitlerin eldesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Abdel-Hamid ve ark., 2017; Aguilar-Toala ve ark., 2017; Tsai ve ark., 2008; Welsh ve ark., 2017). Bu çerçevede yapılan bu çalışmanın amacı; peynir altı suyunun farklı tür probiyotik mikroorganizmalarla fermentasyonu ve bitkisel kaynaklı proteolitik enzimler yoluyla hidroliz edilerek biyoaktif peptitler yönünden terapötik yönü iyileştirilmiş peyniraltı suyunun üretilmesidir. Bu amaç doğrultusunda; piyasada bulunan peynir altı suyunun besinsel yönden iyileştirilmesi/zenginleştirilmesi düşünülmüştür. Çalışmada, üretilen peynir altı sularının fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve biyolojik özelliklerinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Esasen, peynir altı suyundan, peynir altı suyu tozu (PST/WP), peynir altı suyu protein izolatları (PSI/WPI) ve peynir altı suyu konsantratları (PSC/WPC) endüstriyel boyutta özellikle yurtdışında üretilmektedir. Ancak, besinsel yönden fonksiyonel özelliği artırılmış, biyoaktif peptit içeren peynir altı suyu tozu üretiminin çok kısıtlı olduğu bilinmektedir. Özellikle çocuk ve sporcu beslenmesi açısından bakıldığında enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiş peynir altı suyu hidrolizatı Fonterra Co-operative Group ve Davisco Foods International Inc. gibi dünya çapındaki sınırlı sayıda firma tarafından üretilmektedir.



Çalışma sonucunda;

1. Süt endüstrisinde yan ürün olarak yüksek miktarda üretilen peynir altı suyunun daha verimli şekilde değerlendirilme olanaklarının araştırılmasının sağlanacağı,
2. Gıda endüstrisi için fiziksel, kimyasal, biyolojik, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri detaylı şekilde ortaya konmuş fonksiyonel bir gıda katkı maddesinin üretiminin sağlanabileceğı,
3. Fermentasyon ve bitkisel kaynaklı enzimatik hidroliz yoluyla üretilen peyniraltı suyunun toz haline getirilerek, belirli biyoaktivite özellikleri açısından incelenecek olması, tüketicilerin gıda katkı maddelerine karşı sahip oldukları olumsuz düşüncelerin giderilmesi açısından önemli bir adım olacağı,
4. Proje sonuçlarının ülkemizde katkı maddeleri üretimi yapan işletmeler tarafından kullanılması ve fonksiyonel özelliğı arttırılmış peyniraltı suyu tozunun üretiminin gerçekleştirilmesi sonucunda ulusal ve uluslararası düzeyde ekonomik kazanç elde edilmesinin sağlanabileceğı düşünölmüştür.

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Peynir Altı Suyu ve Genel Özellikleri

Peynir altı suyu, serum proteinleri olan laktalbumin, laktoglobülin, laktoz, yağ, mineral madde ve vitaminleri içeren önemli bir yan üründür (McIntosh ve ark., 1998). Sütün maya (rennet) veya organik asitle pıhtılaştırılmasından ve pıhtı kırımını takiben, geride kalan yeşil-sarı renkteki kısım peynir altı suyu olarak adlandırılmaktadır. Peynir yapımında kullanılan sütün % 80-90'ı peynir altı suyu olarak ayrılmaktadır. Fakat bu miktar yapılan peynir çeşidine göre farklılık göstermektedir (Anonymous, 1995). Peynir altı suyu, “tatlı peynir altı suyu” ve “ekşi peynir altı suyu” olarak iki farklı şekilde meydana gelmektedir. Ekşi peynir altı suyu, fermente asit veya fermentasyon sonucu üretilen süt ürünlerinden elde edilirken, tatlı peynir altı suyu, enzim ile sütün pıhtılaştırılması sonucu ortaya çıkmaktadır (Metin, 1983). Genel olarak ekşi peynir altı suyu, kalsiyum laktat içerirken tatlı peynir altı suyunun serbest kalsiyum içeriği asit peynir altı suyuna göre daha yüksektir (Tsakali ve ark., 2011). Sütü pıhtılaştırmada kullanılan pıhtılaştırıcının çeşidine göre peynir altı suyunun bileşimi de büyük değişkenlik göstermektedir. Bu pıhtılaştırıcılar organik asit veya enzim (rennet) olabilmektedir. Genellikle asit veya fermentasyon ile pıhtılaştırılan süttten elde edilen peynir altı suyunun protein ve mineral madde miktarı enzim ile pıhtılaştırılan süttten elde edilen peynir altı suyundan daha yüksektir (Child ve Droke, 2010). Rennet kazein ile üretimi gerçekleştiren gıda işletmelerinde ortaya çıkan peynir altı suyu “tatlı peynir altı suyu”dur ve pH'sı 5,9 - 6,6 arasındadır. Mineral asit yoluyla pıhtılaştırılmış kazein üretiminden ise ekşi (asitli) peynir altı suyu elde edilmekte ve pH'sı 4,3 ile 4,6 arasındadır. Çizelge 2.1'de tatlı ve ekşi peynir altı suyunun bileşimi verilmiştir. (Anonymous, 1995; Jeličić ve ark., 2008).

Çizelge 2.1. Tatlı ve ekşi peynir altı suyunun bileşimi (Yerlikaya ve ark., 2010).

Bileşen (g/L)	Tatlı peynir altı suyu	Ekşi peynir altı suyu
Toplam Kurumadde	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Laktoz	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Protein	6.0 – 10.0	6.0 – 8.0
Kalsiyum	0.4 – 0.6	1.2 – 1.6
Fosfat	1.0 – 3.0	2.0 – 4.5
Laktat	2.0	6.4
Klorür	1.1	1.1

Besin değeri yüksek proteinlerce zengin olan peynir altı suyu, beslenme açısından önem arz etmektedir. Peynir altı suyu bileşiminin yaklaşık % 93'ü su olmasına rağmen kurumaddesinin büyük bir kısmını laktoz ve biyolojik değeri yüksek serum proteinleri oluşturmaktadır (Yerlikaya ve ark., 2012).

Peynir altı suyu proteinleri, serum proteinleri olarak bilinmekte olup farklı moleküler ağırlıklara ve biyolojik özelliklere sahiptirler. Peynir altı suyu proteinleri, peynir altı suyu içerisinde bulunan miktarlarına göre major ve minor olarak gruplandırılabilirler. Majör serum proteinleri;  $\beta$ - laktoglobulin,  $\alpha$ - laktalbumin, serum albumin, immünoglobulinler ve glikomakropeptitlerdir. Minör serum proteinleri ise transferrin, laktoperoksidaz, laktoferrin, mikroglobulin ve glikoprotein- $\alpha$ 'den oluşmaktadır. Peynir altı suyunda protein harici kobalamin, folik asit ve riboflavin de önemli miktarlarda bulunur. Söz konusu bu bileşenler; peynir üretimi sonrasında çoğunlukla peynir altı suyu proteinlerine bağlı durumdadırlar. Peynir altı suyunun, sütten daha yüksek miktarda riboflavin içerdiği durumlar da görülmüştür. Bu durum, peynir üretiminde kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin aktivitelerinden kaynaklanabilmektedir. Yüksek riboflavin içeriğinden dolayı, peynir altı suyu karakteristik sarı-yeşil renge sahiptir (Fitsimons ve ark., 2007; Pihlanto ve Korhonen, 2003).

Peynir altı suyu proteinlerinin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olduğu yapılan birçok çalışmada gözlemlenmiştir. Peynir altı suyunun tümör oluşumunu engellediği ve bu şekilde bazı kanser türlerine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Hakkak ve ark., 2001; Papenburg ve ark., 1990). Peynir altı suyunun kalsiyum, fosfor ve B grubu vitaminlerce zengin oluşu, laktik asit ve biyolojik değeri yüksek proteinler içermesi bu ürünün besin değerini yükseltmektedir. Peynir altı suyu proteinleri metabolizmanın büyümesinde, gelişmesinde ve onarılmasında aktif rol aldıklarından dolayı bebek mamalarında, immün sistemi bozulmuş kişilerin beslenmesinde ve sporcu içeceklerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Kurt ve Gülümser, 1988; Pala, 1997).

Peynir altı suyu, sütün serum fazındaki besin öğelerini içeren değerli bir ürün olduğundan, bu ürünün katma değeri yüksek yeni ürünlere dönüşümünü sağlamak büyük önem taşımaktadır. Günümüzde peynir üretimindeki artışa paralel olarak peynir altı suyu miktarı da artmış ve peynir üreticisi firmalar için peynir altı suyunu bertaraf etme zorunluluğu doğmuştur. Peynir altı suları yüksek organik madde içeriğine, yani çevre kirliliği için önemi bir ölçüt olan yüksek biyolojik oksijen ihtiyacına sahiptirler. Bu

kapsamda işletmelerin, peynir altı sularını peynir altı suyu tozu veya benzer ürünler üreten firmalara ulaştırması ve çevreye zarar vermeden bertaraf edilmesini sağlaması gerekmektedir (Üçüncü, 2005). Çünkü, peynir altı suyunun kimyasal ve biyolojik oksijen ihtiyaçları ile içeriğindeki laktoz ve diğer maddelerin fermentasyona uğrayabilme potansiyelleri çok yüksektir. Bu nedenle, hiçbir işlem görmeden deşarj edilen peynir altı suları önemli düzeyde çevre kirliliğine yol açmaktadır (Metin, 1983; Üçüncü, 2005).

## **2.2. Peynir Altı Suyunun Kullanım Alanları**

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle peynir altı suyunun gıda sanayinde ve gıda dışı endüstrilerde farklı alanlarda kullanımı önem kazanmıştır. Ancak, uzun yıllar boyunca birçok ülkede peynir altı suyu hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Savaş yıllarında Almanya’da baş gösteren kıtlık ve hammadde sıkıntısından dolayı peynir altı suyu ekmek mayası, bira ve sirke gibi birçok gıda ürününün üretiliminde kullanılmıştır (Dinçoğlu ve Ardıç, 2012).

Ülkemizde peynir altı suyu çoğunlukla lor peynir yapımında kullanılmaktadır. Bu amaçla peynir altı suyuna kalsiyum ve tuz ilave yapıldıktan sonra ısıtılarak süzülmekte, ve lor peyniri kitlesi elde edilmektedir. Avrupa ülkelerinde ise yine farklı çeşit peynirlerin üretilmesinde peynir altı suyu kullanılabilir. Örneğin; İtalya’da tüketimi yüksek olan Ricotta peyniri peynir altı suyundan üretilmektedir (Dinçoğlu ve Ardıç, 2012).

Günümüzde, peynir altı suyu ultrafiltrasyon, mikrofiltrasyon, ters osmoz, iyon değişimi gibi işlemlerden geçirilerek kurutulmakta ve peynir altı suyu ürünleri elde edilmektedir. Söz konusu ürünler; peynir altı suyu tozu, demineralize peyniraltı suyu, peynir altı suyu tozu izolatu (PSI/WPI), peynir altı suyu konsantratu (PSK/WPC) ve peynir altı suyu hidrolizatu olarak tanımlanmaktadır (Yerlikaya ve ark., 2012). Ülkemizde ticari olarak sadece peynir altı suyu tozu ve bunun farklı oranlarda demineralize formları üretilebilmektedir. Türk Standartları Enstitüsü TS 11860’e göre tatlı peynir altı suyu tozu “peynir mayası kullanılarak peynir yapımı sırasında kazein ve yağın pıhtı olarak ayrılmasından sonra, geri kalan ve bileşimi peynir çeşidine ve yapım tekniğine bağlı olarak değişen sıvının toz haline getirilmesiyle elde edilen mamul” olarak tanımlanırken, ekşi (asitli) peynir altı suyu tozu ise “sütün asit ile çöktürülmesi sonucu oluşan çöküntüden teknolojisine göre süzülerek elde edilen sıvının toz haline getirilmesiyle elde edilen mamul” olarak ifade edilmektedir (Anonymous, 1995).

Son yıllarda peynir altı suyundan elde edilen proteince zengin ürünler yoğurt üretiminde de kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle pıhtının sıkılaşmasını, su salmanın azalmasını ve aromanın zenginleşmesini sağlamak için peynir altı suyu proteinlerinden yararlanılmaktadır. Krema ve buna bağlı olarak tereyağı üretiminde de peynir altı suyu veya türevleri kullanılabilir (Dinçoğlu ve Ardıç, 2012). Nitekim, ülkemizde küçük ve orta ölçekteki süt işletmeleri, peynir üretimlerinden açığa çıkan peynir altı suyunu seperatörlerden geçirip krema ve tereyağı elde ederek ekonomik kazanç sağlamaktadırlar.

Peynir altı suyu tozu fırıncılık ve pastacılık ürünlerinde sıklıkla kullanılan ingrediyeentlerin başında gelmektedir. Ekmek, kek, poğaçaya gibi yaygın tüketilen unlu mamüllerin iç gözenek yapıları ve hacimsel özellikleri, önemli kalite kriterleri olarak kabul edilmektedir. Peynir altı suyunun yüksek laktoz içeriğinin özellikle mayalamanın aktif rol oynadığı unlu mamüllerde, maya aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, proteince zenginleştirme ve iç gözenek yapısının homojen dağılım sergilemesinde de peynir altı suyu ile katkılamamanın olumlu etkileri rapor edilmiştir (Bilgin ve ark., 2006).

Ortalama % 93 su içeriğine sahip olan peynir altı suyu, içecek üretimi için de değerli bir hammadde niteliği taşımaktadır. Son yıllarda, peynir altı suyu esaslı içeceklerin üretimi giderek önem kazanmış ve 4 farklı grup altında kategorize edilmiştir. Bunlar meyve ve/veya sebze suları içeren peynir altı suyu karışımları, süt esaslı koyu kıvamlı içecekler (fermente veya non-fermente), alkollü peynir altı suyu içecekleri (bira, şarap, likör vb) ve susuzluğu giderici gazlı içecekler olarak sınıflandırılabilirler (Russ and Meyer-Pittroff, 2004; Chavan ve ark., 2015). Narenciyelerin ve mango, ananas gibi tropik meyvelerin peynir altı suyunun pişmiş aromasının baskılanması için yaygın olarak kullanılan meyveler olduğu, muz, armut, şeftali gibi meyvelerin ve bal, vanilya gibi doğal tatlandırıcıların da içecek üretiminde tercih edildiği bildirilmiştir (Djurić ve ark., 2004, Jelić ve ark., 2008). Castro ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* kültürü kullanılarak üretilen çilek aromalı probiyotik sütlü içeceklere farklı oranlarda (0, 20, 35, 50, 65 ve 80%) peynir altı suyu konsantratları ilave edilmiştir. Katkılama düzeyindeki artışın, içeceklerin jel yapısındaki kırılabilirliği artırdığı ve % 65'in üzerindeki katkılamamanın ise duyusal kalite ve tüketici kabulü bakımından düşük skora sahip olduğu belirtilmiştir.

$\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, serum albumin gibi serum proteinlerince zengin peynir altı suyu, gerek gıdaların proteince zenginleştirilmesinde, gerekse emülsifiye etme, su bağlama, jelleşme gibi fonksiyonel özellikleri geliştirmesi sebebiyle farklı ürün

formülasyonlarında kullanılmaktadır. Proteinlerin, fonksiyonel etkilerinin ve biyoyararlılıklarının, peynir altı suyu üretimi esnasındaki koşullara bağlı olduğu önemle vurgulanmaktadır (Bryant ve McClements, 1998). Çikolata yapımında peynir altı suyu tozu (PST/WP), peynir altı suyu tozu izolatu (PSI/WPI) ve peynir altı suyu konsantratu (PSK/WPC) kullanılarak çikolatanın besin değeri artırılmaktadır. Ayrıca bu ürünlerin yapı, kıvam ve tat üzerine de olumlu etkileri vardır. Peynir altı suyundan elde edilen diğer bir ürün ise laktoz'dur. Peynir altı suyundaki proteinlerin, yağların ve mineral maddelerin ayrıştırılmasından sonra geriye kalan sıvının koyulaştırılması ve kristalleştirilmesiyle laktoz elde edilir. Laktoz özel diyet menülerinin hazırlanmasında, bebek maması üretiminde, ilaç sanayinde, penisilin üretiminde, boya sanayinde, laktoz şuruplarının hazırlanmasında ve laktik asit üretiminde kullanılır. 1 kg laktoz şurubu yaklaşık 470 g sakkaroz eşdeğerdur. Bu nedenle özellikle meyveli yoğurt, dondurma, unlu tatlılar, meyve sosları vb. üretiminde sakkaroz yerine kullanılır (Üçüncü, 2005).

Peynir altı suyunun, gıda endüstrisinin yanında birçok farklı kullanım alanına sahip olduğu belirtilmiştir. Bunlar arasında; vitamin B12 üretimi, biyogaz üretimi, yenilebilir film (ambalaj materyali) üretimi, laktik asit, asetik asit ve sitrik asit üretimi, biyokütle (tek hücre proteini) üretimi, sporcu besinleri üretimi, bebek maması üretimi, eczacılık, tıp, kimya ve kozmetik sanayinde kullanımı yer almaktadır (Dinçoğlu ve Ardiç, 2012).

### **2.3. Süt Kaynaklı Biyoaktif Peptitler, Oluşumları ve İnsan Sağlığına Etkileri**

Biyoaktif peptitler, gıdalarda doğal olarak bulunan proteinlerin (özellikle süt proteinlerinin) ileri teknolojik yöntemler kullanılarak starter kültürlerle fermentasyonu veya enzimlerle hidrolizi sonucu elde edilen, et, süt, yumurta, soya gibi besinlerde bulunan, normal ve yeterli beslenmede metabolizmada düzenleyici işlevlere ve biyolojik aktiviteye sahip özgün protein parçalanma ürünleridir. Yapısal protein içinde aktif olmadığı halde, uygun enzim muamelesi sonucu önemli fizyolojik etkilere sahip aminoasit zincirleri "biyoaktif peptitler" olarak ifade edilmektedir (Kınık ve Gürsoy, 2002; Meisel, 1997; Korhonen ve Pihlanto-Leppala, 2000). Proteinlerin sahip olduğu biyoaktif etki çoğunlukla tek bileşen kaynaklı olmakla beraber, birden fazla bileşenin ortak etkisiyle ortaya çıkan biyoaktivitelerin de olduğu bilinmektedir. Diğer bir ifadeyle biyoaktivite, farklı bileşenlerin etkileşimi ile ortaya çıkan bir durumdur (Meisel, 1997). Proteinlerin fonksiyonel özellik kazanmalarında önemli rol oynayan, biyolojik aktiviteye sahip peptitler, *in-vivo*

(gastrointestinal sindirim) ve *in-vitro* (enzimatik yolla) yollarla oluşabilmektedir. Bunun yanı sıra, kimyasal olarak sentezlenen biyoaktif peptit zincirlerinin de olduğu bilinmektedir (Kınık ve Gürsoy, 2002). Biyoaktif peptitler; a) mikrobiyal veya bitkisel kaynaklı enzim faaliyetleri, b) asit/baz hidrolizasyonu, c) proteolitik starter kültürlerin fermentasyonu, sonucu oluşabilmektedir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000).

Beslenme değeri açısından bakıldığında, süt proteinleri arasında yer alan kazein, en değerli biyoaktif peptit kaynaklarından biridir. Ancak, son yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte membran filtrasyon teknikleri kullanılarak peynir altı suyundan izole edilen  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktoglobulin'in de biyoaktif aminoasit zincirleri içerdiği görülmüştür (Kınık ve Gürsoy, 2002). Bu nedenle süt serumunu oluşturan peynir altı suyundan, biyoaktif özelliğe sahip peptitlerin üretilebileceği görülmüştür.

Süt ve süt ürünlerinin tüketimi sonrasında sindirim kanalında meydana gelen biyoaktif peptitlerin, farklı fizyolojik etkilere sahip olabildiği bildirilmiştir (Çizelge 2.2) (Clare ve Swaisgood, 2000). 64 aminoasitten oluşan kazeinmakropeptit (CMP) dışında biyoaktif peptitlerin ortalama 3 ile 20 arasında aminoasit içerdiği rapor edilmiştir (Pihlanto-Leppälä, 2001). Doğal protein yapısı içerisinde inaktif konumda yer alan biyoaktif peptitlerin aktivite kazanımları *in-vivo* ve *in-vitro* koşullarda meydana gelen parçalanma reaksiyonları sonucu gerçekleşmektedir. Peptit zincirinin yapısal olarak küçük ve suda çözünmeyen karakterde olması, absorpsiyonu üzerinde olumlu etkiye sahiptir (Meisel, 1997; Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000). Peptit zincirinin üzerinde yer alan aminoasitlerin türü ve konuşlanmalarına ek olarak, karboksi (C)-terminal veya amino (N)-terminal pozisyonunda yer alan aminoasitlerin türü de peptitin spesifik etki göstermesinde önemli role sahiptir. C-terminal pozisyonda prolin aminoasiti bulunmasının, angiotensin I dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu için kritik önem taşımaktadır. Benzer biçimde, enzimatik parçalanmayla  $\beta$  kazeinden elde edilen antihipertansif etkiye sahip peptit zincirinin (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln), C-terminal ucundaki aminoasidin (Gln) uzaklaştırılması sonucu ikinci bir fonksiyonel özellik (ACE inhibitörü) kazandığı bildirilmiştir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000).

Gıda üretimi sırasında uygulanan prosesler sırasında, hammadde içerisinde bulunan proteinler fonksiyonel ve biyolojik özellikleri bakımından hızla değişime uğrarlar. Örneğin pH değişikliğine yol açan kimyasal işlemler, bir veya daha fazla aminoasidin modifiye olmasıyla proteinlerin fonksiyonel özelliklerini ve besleyici değerini belirleyen

sindirilebilirliği etkileyebilmektedir. Yine ısı işlemler, denatürasyona bağlı olarak enzim inhibitör aktiviteleri üzerinde etkili olabilmektedir. Ayrıca enzimatik hidroliz sonucu biyoaktif peptitlerin ve diğer potansiyel birçok reaksiyonun meydana gelmesi söz konusudur (Anantharaman ve Finot, 1993; Finot, 1997). Gıda teknolojisinde çok farklı proses uygulamaları bulunmaktadır. Gıdaların üretiminde ısı işlem ve fermentasyon sıklıkla kullanılmaktadır. Isıl işlem gıda endüstrisinde kullanılan en eski ve en yaygın yöntemdir. Gıdalarda sterilizasyonu sağlama, kıvam ayarlama ve gıdaların yenilebilir hale getirilmesi gibi pek çok alanda ısı işlem kullanılmaktadır. Isıl işlemin yoğunluğuna bağlı olarak proteinlerde yapısal modifikasyonlar meydana gelerek hem teknolojik açıdan önemli olan fonksiyonel özelliklerde hem de proteinlerin biyolojik değerini belirleyen besin özelliklerinde değişimler ortaya çıkabilmektedir (Boye ve ark., 1997).

Çizelge 2.2. Süt ve süt ürünleri kaynaklı bazı biyoaktif peptitler (Meisel, 1997)

Protein Kaynağı	Enzim	Peptit	Biyoaktivitesi
<b><math>\alpha</math>-Laktalbumin</b>	Pepsin	$\alpha$ -Laktoforin	ACE İnhibitörü
	Pepsin	$\alpha$ -Laktoforin (f50-53)	Opioid Aktivite,
	Tripsin	$\alpha$ -LA (f50-51), $\alpha$ -LA (f99-	ACE İnhibitörü
	Tripsin	$\alpha$ -LA (f18-20)	İmmunopeptit
<b><math>\beta</math>-Laktoglobulin</b>	Pepsin	$\beta$ -Laktoforin	İleum Uyarılması
	Tripsin-	$\beta$ -Laktoforin (f142-148)	ACE İnhibitörü
	Tripsin-	$\beta$ -Laktoforin (f102-105)	Opioid Aktivite,
	Kimotripsin	$\beta$ -Laktotensin (f146-149)	İleum Kasılması
	Tripsin	$\beta$ -LG (f22-25), $\beta$ -LG (f32-40),	ACE İnhibitörü
	Proteinaz K	$\beta$ -LG (f81-83)	ACE İnhibitörü
<b>Serum Albumini</b>	Tripsin	$\beta$ -Laktokinin (f102-103)	ACE İnhibitörü
	Pepsin	Albutensin (f208-216)	ACE İnhibitörü,
<b>Laktoferrin</b>	Pepsin	Serorfin (f399-404)	Opioid Aktivite
	Kimotripsin	Laktoferrisin B (f17-47)	Antimikrobiyal
<b>Laktotransferrin</b>	Pepsin	Laktoferroksin A (f318-323),	Opioid Antagonist
	Pepsin	B (f536-540),	
<b>Proteoz-Pepton</b>	Pepsin	Trombin İnhibitör Peptit (f39-	Antitrombotik
	Pepsin	Kasoplatelin	Antitrombotik
<b>Proteoz-Pepton</b>	Plasmin	PP 8 (f1-28)	Opioid Aktivite, Ca
<b>Glikomakropeptit</b>	Tripsin	Trombin İnhibitör Peptit	Antitrombotik

Biyoaktif peptitlerin oluşumunda en iyi bilinen tekniklerden biri de enzimatik parçalama'dır. Bu amaçla en yaygın kullanılan enzimlerden biri tripsin olup, ACE-inhibitör aktivitesine sahip peptitlerin üretiminde tripsin tercih edilmektedir. Bununla birlikte



kimotripsin, pankreatin, pepsin gibi enzimlerin tek başına veya birlikte kullanımları da biyoaktif peptit oluşumunda ciddi öneme sahiptir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000). Enzimatik parçalanma sonrası, spesifik peptit fraksiyonlarının elde edilmesinde membran filtrasyon tekniklerinden yararlanılabileceği bildirilmiştir. Tekniğin prensibi membran yüzeyi ve biyoaktif peptitler arasında oluşan elektriksel yük etkileşimine dayanmaktadır. Membran filtrasyon teknikleri, hem düşük molekül ağırlığına sahip peptitlerin ayrılmasına hem de yüksek düzeyde zenginleştirme yapılmasına imkan sağlamaktadır (Bargeman ve ark., 2000). Korhonen ve Pihlanto-Leppälä (2000), tarafından yapılan bir çalışmada, ultrafiltrasyon tekniği ile keçi sütünden elde edilen peynir altı suyundan bir opioid peptit olan  $\alpha$ -laktorfin elde edildiği bildirilmiştir.

Biyoaktif peptitler proteolitik kültürlerle sütün fermentasyonu sırasında da oluşabilmektedir (Tirelli ve ark., 1997). Doğal veya kontrollü fermentasyon, binlerce yıldır insanoglunun gıdaların besin içeriklerini ve duysal özelliklerini korumak veya değiştirmek için kullandığı bir yöntemdir. Fermentasyon prosesi, hammaddede doğal olarak bulunan veya sonradan eklenen mikroorganizmalar yani starter kültürler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Bu mikroorganizmalar gelişim sürecinde şekerleri ve proteinleri hidroliz ederler. Böylece farklı aminoasit dizilimine sahip peptitler ve serbest aminoasitler oluşur. Proteoliz derecesi, bakteri türüne ve fermentasyon koşullarına bağlıdır. Fermentasyon sırasında gıdalardan elde edilen bu peptitler ve aminoasitler genellikle fermente ürünün fonksiyonel, reolojik, duysal ve biyolojik özelliklerini değiştirir (Korhonen ve ark., 1998). Fermentasyon sırasında, laktik asit bakterileri, sütteki kazeini hidroliz ederek büyük peptit parçaları oluşturur. Bunlar hücre içine taşınarak hücre içi peptidazlarla parçalanıp çeşitli büyüklükte peptitlere dönüşür ve bu peptitler genellikle ACE inhibitör aktivitesine sahiptir (Yamamoto ve ark.,1994).

Laktik asit fermentasyonu sırasında, bakteriyel kaynaklı proteolitik enzimlerin aminoasitler, dipeptitler, tripeptitler ve bazı oligopeptitler (maksimum 18 aminoasite sahip) için transfer görevi sağladığı, daha büyük oligopeptitlerin ise ancak hücre duvarının yıkımı sonrası hücre içine girerek burada hücrel peptidazlarla hidroliz sonucunda biyoaktif peptitleri oluşturduğu rapor edilmiştir. *In vivo* sistemde ise, gastrointestinal enzimlerin uzun oligopeptitleri bile parçalayabildiği ve bağırsakta serbest kalan bir biyoaktif peptitin, kan dolaşımı vasıtasıyla vücudun diğer sistemlerine (sinir, immune, kardiyovasküler sistem vb.)

ulaşıp koşullara bağılı olarak fizyolojik etki sergileyebileceğı bildirilmiştir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000).

Süt proteinlerinden elde edilmiş biyoaktif peptitlerin insan sağığına etkileri incelendiğinde sindirim sistemi, bağışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem ve sinir sistemi üzerinde etkileri olduğı görülmektedir. Biyoaktif peptitlerin, bu sistemlerdeki majör etkilerine ilaveten, sistemlerle ilişkili yardımcı faaliyetlerde de (faydalı bakterilerin gelişimini teşvik etme, mineral absorpsiyonunu artırma vb.) kritik role sahip olduğı bilinmektedir (Preuffer ve Schrezenmeir, 2000).

Biyoaktif peptitlerin mide-bağırsak sistemi üzerinde, gastrik boşalmanın ve intestinal hareketliliğın indirgenmesi yönünde bir etkiye sahip olduğı rapor edilmiştir (Pihlanto-Leppälä, 2001). Buna benzer biçimde bazı biyoaktif peptitlerin, hayvanlarda bağırsak salgılarının azalması ve kandaki insülin seviyelerinin regule edilmesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğı da bilinmektedir (Tome ve Ledoux, 1998).

İnsanların günlük beslenme menüsünün bağışıklık sistemi üzerindeki rolü göz önüne alındığında, hayvansal kaynaklı ürünlerin tüketimi teşvik edilmektedir. Bu listenin başında süt ve süt ürünleri gelirken, özellikle fermente süt ürünleri biyoaktif peptit bakımından zengin olan içerikleriyle dikkat çekmektedir. Bu kapsamda, biyoaktif peptitlerin gerek antimikrobiyal gerekse immüno-modülatif etki sergileyerek bağışıklık sistemini olumlu yönde etkileyebileceğı kanıtlanmıştır (Pihlanto-Leppälä, 2001). Süt serum proteinleri içerisinde yer alan immünoglobulinler, laktoferrin ve laktoperoksidazların antimikrobiyal etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve bu proteinlerin hidrolizi sonucu açığa çıkan peptitlerin de benzer şekilde antimikrobiyal etkiye sahip olduğı doğrulanmıştır (Hoer ve Bostwick, 2000). Tome ve Ledoux (1998), laktoferrinin patojenlere,  $\alpha$ -kazein kaynaklı isracidin peptitinin ise *Staphylococcus aureus*' a karşı antibakteriyel etki sergilediğini tespit etmişlerdir.

Kişinin iç ve dış kökenli stres ve hastalık faktörlerine, akut ve kronik rahatsızlıklara karşı direnç göstermesinde immune (bağışıklık) sistemin rolü birçok klinik çalışma ile ortaya koyulmuştur. Biyoaktif fonksiyonlara sahip peptitlerin bağışıklık sistemi üzerindeki pozitif veya negatif etkileri farklı yollarla olabilmektedir. Antikor üretimi, sitotoksik aktivite, lenfositlerin çoğalmasının teşvik edilmesi vb. mekanizmalar bunlara örnek verilebilir. Biyoaktif peptitlerin türüne bağılı olmak koşuluyla, yüksek yada düşük dozlarda farklı immunomodülatör etki sergileyebileceğı bildirilmiştir. Örneğın düşük dozlarda kasomorfının

lenfosit çoğalmasını baskıladığı, yüksek dozda ise düzenleyici yönde etki sağladığı bildirilmiştir (Gill ve Rutherford, 1998).

Kan pıhtılaşması için elzem proteinlerden biri olan fibrinojenin, bu kritik rolü yapısında bulunan gama zinciri sayesinde gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar, fibrinojen gama zinciri ile anne sütü veya inek sütünün yapısında yer alan k-kazein zincirinin yapısal olarak birbirine benzediğini göstermiştir. K-kazeinin taşıdığı bu özellik, fibrinojenin gama zinciri ile birleşmesine ve trombosit agregasyonunu engellemesine neden olmaktadır (Tirelli ve ark., 1997). Ayrıca günlük yaklaşık 2 porsiyon süt ve yoğurt tüketiminin, antitrombotik etki gösteren serum kazeinoglikopeptit düzeyini artırdığı rapor edilmiştir (Chabance ve ark., 1998).

Angiotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü ilaçlar, hipertansiyon ve kronik kalp rahatsızlıklarında kullanımı giderek yaygınlaşan ilaçlardır (Eygör ve ark., 2015). Biyoaktif peptitlerin ACE inhibitör aktivitesi sergilediği ve böylece kalp-damar sistemi üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Donagh ve ark. 1999; Haque ve ark., 2008; Barac ve ark., 2017)

Biyoaktif peptitlerin kanıtlanan opioid (morfin benzeri) etkilerinin, kişinin sinir sistemi üzerindeki pozitif sonuçlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Klinik olarak da opioid peptitlerin, (beta-kazomorfın,  $\alpha$ -lactoferrin,  $\beta$ -lactoferrin) damar yoluna verilmesinin yatıştırıcı, uykuya geçişi kolaylaştırıcı ve analjezik fonksiyonlara sahip olduğu bildirilmiştir. (Akhtar, 2017; Kaur ve ark., 2019)

Biyoaktif peptitlerin sinir, sindirim, bağışıklık ve kalp-damar sistemi üzerindeki klinik fonksiyonlarına ek olarak minor biyolojik fonksiyonlar da sergileyebildiği rapor edilmiştir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000). Özellikle kazein fosfopeptitleri, bağırsaklardan vücuda kalsiyum ve demir emilimini artırıcı yönde olumlu etki sağlamaktadır. Bunlara ek olarak anti-oksidatif, anti-diabetik, anti-kanser, anti-lipemik bulgular da farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Sharma ve ark., 2011; Trivedi ve ark., 2015; Dalir ve ark., 2018)

#### **2.4. Süt Sanayinde Bitkisel Enzimlerin Biyoaktif Peptit Üretiminde Kullanımı**

Enzimler, tepkimeyi hızlandıran ve tepkimeden bozulmadan çıkan biyolojik katalizörlerdir. Canlılar tarafından farklı metabolik yollarla sentezlenmektedirler. Enzimler protein yapısında olup hücre içerisinde veya hücre dışında aktivite gösterebilmektedirler. Enzimler farklı biyokimyasal reaksiyonları katalizleme özelliğindedirler. Proteinlerin daha

küçük peptit yapılarına parçalanmasını gerçekleştiren enzimler genel olarak “proteazlar” olarak adlandırılmaktadır. Proteazlar, endüstriyel enzim ticaretinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Proteazlar, et, deri, ilaç, deterjan, süt ve alkollü içecekler gibi birçok sektörde kullanılmaktadır. Proteazlar endo proteazlar ve ekzo proteazlar olmak üzere 2 şekilde sınıflandırılmaktadır. Endo proteazlar; serin, sistein, aspartil ve metallo proteazlar olarak gruplanırken, ekzo proteazlar; amino proteazlar ve karboksi proteazlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Proteazlar hayvansal, bitkisel ve mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilebilmektedirler (Anonim, 2018). Süt sektöründe en fazla kullanılan proteaz özelliğe sahip enzim hayvansal kaynaklı rennettir. Rennet sütün pıhtılaştırılmasında ve peynir üretiminde kullanılmaktadır. Rennet, buzağı şirdeninden elde edilmekte ve yüksek miktarda kimotripsin içermektedir. Son yıllarda, rennet enziminin mikrobiyel yollarla üretimi gerçekleştirilmiş ve ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır. Buna göre, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica* küflerinden ve genetik olarak değiştirilmiş *Escherichia coli* ve *Kluveromyces lactis* bakterileri ile rennet enzimi biyoteknolojik olarak üretilmektedir (Metin, 1998). Hayvansal ve mikrobiyolojik rennete alternatif olarak bitkisel pıhtılaştırıcı enzimlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Doğal olarak çeşitli bitkilerde bulunan enzimler proteolitik aktivite göstermekte ve sütün pıhtılaşmasını sağlamaktadırlar (Metin, 1998; Say ve Güzeler, 2016; Say ve ark., 2012). Örneğin; papain, bromelain gibi proteolitik bitkisel enzimler; bitkilerin kök, gövde, sap, tohum, çiçek, meyve ve yaprak gibi belirli bölgelerinde bulunmakta ve farklı yöntemlerle elde edilmektedir. Bitkisel proteazların rennetten farklılığı, yüksek pH ve yüksek sıcaklıkta aktivitelerini sürdürebilmeleri ve yüksek ısı işlem görmüş sütleri de efektif olarak pıhtılaştırabilmeleridir (Say ve Güzeler, 2016; Say ve ark., 2012).

Ülkemiz bitki florası olarak çok zengin olup farklı türdeki endemik bitkiler uzun yıllardan beri halk tarafından çeşitli gıdaların yapımında kullanılmaktadır. Bazı süt ürünlerinin yapımında bu bitkilerin pıhtılaştırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir. İncir (*Ficus carica*), altın çilek (*Physalis peruviana*), teleme otu (*Euphorbia maculata*), kenger otu (*Gundelia tournefortii*) ve nohut (*Cicer arietinum*) sütün pıhtılaştırılmasında kullanılan bitkilere örnek verilebilir (Say ve Güzeler, 2016). Bu çerçevede, yapılan bu tez çalışmasında, kavun, enginar ve ananas kabuklarının kullanılması düşünülmüştür. Kavun, enginar ve ananas kabukları çeşitli proteolitik enzimler içermektedir. Özellikle kavun ve enginarın ülkemizde yüksek miktarda üretildiği bilinmektedir. Diğer taraftan, meyve suyu sanayinde

hammadde olarak kullanılan ananasın meyvesi alınmakta ve soyulan kabukları ise önemli miktarda atık oluşturmaktadır. Bu nedenle üç bitkinin kabuklarından elde edilen proteolitik enzim ekstraktlarının protein türevli terapötik ürünlerin üretiminde kullanılma potansiyeli bulunduğu düşünülmüştür. Nitekim, yapılan çalışmalarda, farklı tür hayvanların sütlerinin doğrudan veya bu hayvanların sütlerinden elde edilen peynir altı sularının hayvansal/ bitkisel kaynaklardan elde edilen proteazlarla muamelesi sonucunda farklı biyoaktif peptitlerin elde edilmesi ve peynir altı suyunun fonksiyonel özelliklerinin artırılması üzerine çalışmalar yürütülmektedir (Abdel-Hamid ve ark., 2017; Welsh ve ark., 2017; Tsai ve ark., 2008). Bu çerçevede, bitkisel doğal kaynaklardan elde edilen proteazların, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında çalışması, bu proteazların biyoteknolojik olarak farklı gıda proteinlerinden biyoaktif peptit üretiminde kullanılmasını sağlamıştır (Mazorra-Manzano ve ark., 2018).

Çalışmada kullanılan kavun, enginar ve ananas bitkileri hakkındaki bilgiler kısaca ifade edilecek olursa; kavun, çevre koşullarına adaptasyonu çok kolay olan ve dünyada yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir. Ülkemiz kavun üretiminde dünyada ikinci sırada yer almakta olup ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen kavun çeşidi *Cucumis melo* L.'dur (FAO, 2010). Kavun, en iyi ılık ve sıcak iklimlerde yetişir. Kavun'un gelişimi en iyi 20-30°C arasındaki sıcaklıklarda olurken, sıcaklığın bu değerlerin altında ya da üstüne seyretmesi büyümeyi negatif yönde etkiler. Kavun, düşük sıcaklıklara ve donmaya karşı çok hassas bir bitkidir (Şalk ve ark., 2008). Kavun kabuklarında süt pıhtılaştırma aktivitesi çok iyi olan cucumisin enzimi bulunmaktadır. Kavun meyvesinden izole edilen cucumisin (EC 3.4.21.25) bir bitki serin proteazıdır. Papain (EC 3.4.22.2) ve ficain (EC 3.4.22.3) gibi bitki proteazları ile cucumisinin süt pıhtılaştırma aktivitesi karşılaştırıldığında, papaininkiyle aynı olmasına rağmen ficain'in yarısı kadardır. Abdalla ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada, kavun gibi cucumisin içeren *Solanum dubium* bitkisinin kabuklarının su ile ekstraksiyonuyla elde edilen enzimin, yüksek pıhtılaştırma aktivitesine ve kısa pıhtılaşma süresine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada Cucumisin enziminin sütü pıhtılaştırma yeteneğinin çok yüksek olduğu ve aktivitesini çok geniş bir pH-sıcaklık aralığında (20-90 °C) koruduğu tespit edilmiştir (Ahmed ve ark., 2009).

Yabani enginar olarak bilinen *Cynara cardunculus*, Compositae familyasına ait olan tropikal bir bitkidir. Portekiz, Kuzey Afrika ve İspanya' nın güney bölgelerinde, ülkemizde ise Ege ve Akdeniz Bölgelerinde çok yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir (Tejada ve ark., 2006; Chazarra ve ark., 2007). Söz konusu bitkiden elde edilen enzim "*Cardoon*" olarak

isimlendirilmektedir ve İspanya yarımadasında 200 yılı aşkın bir zamandır kullanılmaktadır. *Cardoon* ile pıhtılaştırılarak yapılan geleneksel peynirler; kremi yumuşak dokusu ve kendine özgü tadı ile bilinmektedir (Prados ve ark., 2007). *Cardoon* enzimi, özellikle Avrupa'da keçi ve koyun sütünden yapılan birçok peynirin üretiminde kullanılmaktadır (Roseiro ve ark., 2003; Egito ve ark., 2007; Duarte ve ark., 2009). Yabani enginarın boyun kısmı, çiçeği ve tepe bölümlerinde "Cardosin A" ve "Cardosin B" olarak adlandırılan aspartik proteazlar yüksek düzeyde bulunmaktadır. Her iki enzim de kimozone benzer özellikler göstermektedir. Cardosin B, Cardosin A'ya göre daha proteolitik olup her iki enzim de  $\kappa$ -kazein'deki Phe105-Met106 bağına etki etmektedir. Bu enzimin proteolitik aktivitesi yüksektir ve aktivitesini çok geniş bir sıcaklık aralığında (20-70 °C) korumaktadır. 70°C'deki aktivitenin, 40°C ve 20°C'lerdeki aktiviteden sırasıyla 5 ve 10 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Sıcaklığın 80°C civarına ulaşması halinde ise aktivitenin hızla düştüğü tespit edilmiştir (Ahmed ve ark., 2009). *Cardoon* enzimi, diğer pıhtılaştırıcı enzimlere göre daha fazla kullanım potansiyeline sahiptir (Esteves ve ark., 2003). Ancak yapılan çalışmalarda yabani enginardan elde edilen enzimler kullanılarak yapılan peynirlerde acı tat ve doku kusurlarının olduğu saptanmıştır. Söz konusu enzimin tat üzerindeki en olumsuz etkisi, peynirde yüksek proteolitik aktiviteden dolayı acı tat oluşumuna neden olmasıdır (Jacob ve ark., 2011). Yabani enginardan elde edilen enzimlerden biyoaktif peptit üretiminin incelendiği bir çalışmada (Tavares ve ark., 2011a) bitkiden elde edilen proteolitik enzim ekstraktının peynir altı suyu proteinlerinin hidrolizini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Çalışmada peynir altı suyunun enzimatik hidrolizi ile ülser etkisine karşı koruyucu özellik gösteren biyoaktif peptitlerin üretilebileceği tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada (Barros ve ark., 2011), yabani enginar çiçeklerinden elde edilen aspartik proteazın  $\alpha$ -laktalbumin'i büyük ölçüde parçaladığı,  $\beta$ -laktoglobulin'i ise çok düşük oranda hidrolize ettiği belirlenmiştir. Enzimin, her iki proteini de düşük molekül ağırlıklı peptitlere parçaladığı belirlenmesine rağmen biyoaktif özelliklerinin neler olduğu belirlenememiştir.

Ananas (*Ananas sativus*), *Bromeliaceae* ailesinden çok yıllık bir bitkidir (Devi ve ark., 1997). Genellikle, tropikal bölgelerde yetiştirilmektedir (Mohamed ve ark., 2010). Ananas, dünyada üretimi ve ticareti yapılan en önemli bitkilerden biridir (Yusof ve ark., 2015; Bozacı ve ark., 2007). Dünyadaki en önemli üreticileri Tayland, Endonezya, Brezilya, Hawaii, ve Filipinlerdir (Mohamed ve ark., 2010). Ananas meyvesi ılık ve nemli hava koşullarında yetişmektedir. Bu nedenle Türkiye'de Ege, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde çok yaygın bir

şekilde üretimi gerçekleştirilmektedir. Ananas bitkisinin yapraklarından ekstrakte edilen bromelain enzimi ilaç ve gıda endüstrisinin önemli hammaddelerinden biridir (Bozacı ve ark., 2007). Ananasta yüksek oranda bulunan *bromelain* enziminin proteinleri denature etme yeteneği bulunmaktadır ve bu enzimin proteolitik aktivitesi yüksektir. Bromelain enzimi, “Bromelain A” ve “Bromelain B” enzimlerinin karışımından oluşmaktadır. Bromelain enziminin sindirimi kolaylaştırıcı etkisi bulunmaktadır. Bu özelliğinden dolayı et ve et ürünlerinin üretiminde de çokça kullanılmaktadır (Carvalho ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada ananas yapraklarından elde edilen 33 kDa molekül ağırlığına sahip bromelain’in süt proteinlerini pıhtılaştırma aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Duarte ve ark., 2009). Buna göre ham ve kısmi olarak saflaştırılmış enzimin çalışma pH’larının sırasıyla 6,5-7, maksimum süt pıhtılaştırma sıcaklığının ise 55 °C olduğu tespit edilmiştir. Mederios ve ark., (2014) yaptıkları bir çalışmada ananastan elde edilen bromelain enzimi ile inek sütünü kısmi olarak hidrolize ederek “hidrolize inek sütü” formülasyonu geliştirmişlerdir. Araştırmacıların geliştirdikleri “hidrolize inek sütü” formülasyonunda 3-10 kg/mol ağırlığında biyoaktif peptitlerin olduğu ve pıhtılaşmada kullanılan enzim miktarı ve sütün (yağlı/yağsız) çeşidine göre ACE inhibitör aktivitesinin %16,08 ile %43,94 olarak değiştiği belirlenmiştir.

## **2.5. Laktik Bakterilerinin Biyoaktif Peptit Üretiminde Kullanımı**

Laktik asit bakterilerinin birçok grubu gıdaların fermentasyonunda çok eski zamanlardan beri koruyucu olarak kullanılmaktadır. Söz konusu bakteriler, gıda maddelerinin duyuşal özelliklerine olumlu katkısından dolayı gıda fermentasyonunda öncelikle tercih edilmektedirler. Bu nedenle, laktik asit bakterileri artisanal ve geleneksel gıdalardan veya insanların farklı organlarından izole edilebilmektedir. Laktik asit bakterileri insan metabolizması için olumlu etkilere sahip yararlı metabolitleri üretmekte ve bazı türleri probiyotik özellik göstermektedir. Günümüzde laktik asit bakterileri üzerine birçok çalışma yürütülmektedir (Venegas-Ortega ve ark., 2019). Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanıldığı gıdaların başında fermente süt ürünleri gelmektedir. Süt ürünlerinde laktik asit bakterileri, peynirin olgunlaşmasının hızlandırılması, yoğurttta aroma ve tat özelliklerinin zenginleştirilmesi gibi teknolojik amaçlar için kullanılmaktadır. Son yıllarda laktik asit fermentasyonu sonucu oluşan nutrasötiklerin ve antimikrobiyel özellik gösteren bakteriosinlerin üretimini sağlamak için süt ve süt ürünleri içerisinde laktik asit bakterileri

yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Leroy ve Vuyst, 2004). Laktik fermentasyon sonucu, sütte bulunan proteinler (ör; kazein, serum proteinleri) daha küçük peptitlere parçalanarak, opioid, mineral bağlayıcı, ACE inhibitör, antioksidan, antimikrobiyel ve hücre düzenleyici özellikler göstermektedir. (Çizelge 2.3). Le blanc ve ark., (2002) yaptıkları bir çalışmada *Lactobacillus helveticus* R389 ile fermente ettikleri yağsız sütte bağışıklık sistemini düzenleyici peptitlerin oluşumunu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda fermente sütün bileşiminden 3 farklı biyoaktif peptit fraksiyonunun olduğu ve söz konusu fraksiyonların *in vivo* ortamda bağ dokusunda oluşan fibrokarsom tümörüne karşı antitümör etki gösterdiği ve IgA<sup>+</sup>B hücrelerinin artışı sağlayarak da bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada (Chaves-Lopez ve ark., 2014), farklı türde mikrobiyel kültürler kullanılarak ACE inhibitör aktivitesi yüksek fermente süt üretimi incelenmiştir. *P. kudriavzevii* KL84A, *Lactobacillus plantarum* LAT3 ve *Enterococcus faecalis* KE06'in birlikte kullanılmasıyla yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip fermente süt üretiminin gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir. Buna göre, söz konusu fermente sütün peptit içeriğinin 2 mg/ml düzeyinde olduğu ve 6 °C'de 7 günlük depolama süresince fermente sütteki ACE inhibitör aktivitesinin başlangıç ACE inhibitör aktivitesine göre 2 kat, peptit içeriğinin ise 1.7 kat arttığı saptanmıştır.

Liisa Ryhanen ve ark., (2001), 12 farklı laktik asit bakterisi içeren (*Lactococcus* sp. *Leuconostoc* sp. (BD-ti kültür), *Propionibacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp.) ticari karışık kültür ile ürettikleri ve 10 °C'de 4 ay olgunlaştırdıkları Festivo peynirinde ACE inhibitör aktivitesine sahip biyoaktif peptitlerin oluştuğunu belirlemişlerdir. Söz konusu biyoaktif peptitlerin  $\alpha_1$ -kazeinin N-terminal ucunda oluşan f(1-9), f(1-7) ve f(1-6) fraksiyonları olduğu belirlenmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada (Sah ve ark., 2014), yoğurt kültürü (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus*) ile birlikte *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. paracasei* kullanılarak üretilmiş yoğurtlardan elde edilen ham peptit ekstraktlarının özellikleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, yoğurt kültürü ile probiyotik kültür ilave edilen yoğurtların ham peptit ekstraktlarının antitümör ve antioksidan aktivitelerinin sadece yoğurt kültürü kullanılarak üretilen peptit ekstraktlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, araştırmacılar *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. paracasei* probiyotik kültürleri kullanılarak antitümör etkisi artırılmış fermente süt ürünlerinin üretilebileceğini ifade etmişlerdir.



Çizelge 2.3. Süt proteinlerin laktik asit bakterileriyle fermentasyonu sonucu oluşan bazı biyoaktif peptitler (Korhonen ve Pihlanto, 2006; Venegas-Ortega ve ark., 2019)

Laktik asit bakterisi	Öncül Protein	Biyoaktif Peptit
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	$\alpha_{s1}$ ve $\beta$ kazein	Bağışıklık sistemin düzenleyici etkili biyoaktif peptitler: önemli derecede Caco-2 cell hatlarında bazal NF $\kappa$ B aktivitesinin düşürülmesi
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> GR5	$\alpha$ ve $\beta$ kazein	ACE inhibitör aktivite
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 92202	$\alpha$ ve $\beta$ kazein	Bağışıklık sistemin düzenleyici etkili biyoaktif peptitler: HEK <sup>nFRE</sup> hücreleri ile birlikte TNF $\alpha$ bulunması halinde iltihap sökücü etkiile birlikte ile birlikte önemli derecede Caco-2 cell hatlarında bazal NF $\kappa$ B aktivitesinin düşürülmesi
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 92059		ACE inhibitör aktivite, antihipertansif aktivite
<i>Lactobacillus helveticus</i> 92201	$\alpha$ ve $\kappa$ kazein	Opioid aktivite, ACE inhibitör aktivite, Bağışıklık sistemi destekleyici
<i>Lactobacillus</i> GG	$\alpha_{s1}$ ve $\beta$ kazein	ACE inhibitör aktivite
<i>Lactobacillus helveticus</i> CPN 4	Serum proteinleri	ACE inhibitör aktivite
<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	$\kappa$ kazein	ACE inhibitör aktivite
<i>Lactobacillus</i> IFO13953	$\beta$ kazein	ACE inhibitör aktivite
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		ACE inhibitör aktivite
<i>Lb. helveticus</i> ICM 1004 cell free extract	Yağsız süt hidrolizatları	ACE inhibitör aktivite

Laktik asit bakterileri mikrobiyel gelişim gösterirken hem biyoaktif peptitleri hemde antimikrobiyel etkiye sahip protein temelli bakteriosinleri üretmektedirler. Bakteriosin ve biyoaktif peptitlerin üretimi farklı biyokimyasal yollarla gerçekleşmektedir. Laktik asit bakterileri gelişimlerini sağlarken ürettikleri bakteriosinleri hücre dışı ortama salgılamak; biyoaktif peptitler hücrel membran proteazların ortamdaki proteinleri parçalaması sonucu oluşmaktadır. Üretilen biyoaktif peptitler, hücre dışında bulunmakta olup laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemlerindeki azotun asimilasyonu için kullanılmamaktadır. Hem bakteriosinlerin hemde biyoaktif peptitlerin hücre dışında bulunması her iki bileşenin aynı anda sentezlenmesi açısından avantajlı olmasına rağmen her ikisinin de ayrı ayrı saflaştırılması çok zor olmaktadır. Buna rağmen, laktik asit bakterilerinin tek adımda bir çoklu ürün üretme kapasiteleri farklı metabolitlerin ve katkıların üretimi için endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin enzimatik aktivite sonucunda biyoaktif

peptit üretimlerinin gerçekleşebilmesi için mikrobiyel besiyeri ortamının protein miktarının en doğru şekilde ayarlanması gerekmektedir. Biyoteknolojik olarak biyoaktif peptitlerin laktik asit bakterileri tarafından üretilmesi için üretim maliyetinin % 80'ini oluşturan çok pahalı besiyeri ortamları kullanılmaktadır. Bu nedenle gıda endüstrisinde ortaya çıkan yan ürün veya atıkları, hem insan sağlığı için GRAS statüsünde olmaları hemde ekonomik oldukları için önemli alternatif besiyeri ortamları olarak görülmektedir (Venegas-Ortega ve ark., 2019). Peynir üretiminin yan ürünü olarak ortaya çıkan peynir altı suyu, içerdiği protein matriksinden dolayı ( $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, immunoglobulin, serum albumin, laktoferrin ve laktoperoksidaz) laktik asit bakterileri için üzerinde çalışılan en önemli besiyeri ortamıdır. Nitekim, yapılan birçok çalışmada peynir altı suyu kullanılarak hem biyoaktif peptitlerin hem de diğer metabolitlerin üretimi gerçekleştirilmiştir (Madureira ve ark., 2010). Hamme ve ark., (2009) ham keçi sütünden elde edilen peynir altı suyunun *Lactobacillus rhamnosus* ve *Kluyveromyces marxianus* ile ayrı ayrı fermente edilmesiyle sırasıyla % 52 ve % 45 ACE inhibitör aktiviteye sahip fermente peynir altı suyunun üretilebileceğini belirlemişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Ahtesh ve ark. 2016), proteolitik enzim olan Flavourzyme® ile desteklenmiş ve *Lactobacillus helveticus*'un farklı suşlarıyla (881315, 881188, 880474 ve 880953) fermente edilmiş rekonstitüye yağsız süt ve % 4'lük peynir altı suyu konsantratında ACE inhibitör peptitlerin oluşumu incelenmiştir. Çalışma sonucunda, *L. helveticus* 881315 ile fermente edilmiş rekonstitüye yağsız süt ve % 4'lük peynir altı suyu konsantratında *L. helveticus* 881315'un yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu, fermente olmuş her iki ortamda da ACE inhibitör aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. ACE inhibitör peptitlerin oluştuğu en iyi ortamın enzimle desteklenmiş rekonstitüye yağsız süt olduğu bildirilmiştir.

Literatür verileri değerlendirildiğinde, farklı proteolitik enzimler ve/veya laktik asit bakterileri kullanılarak peynir altı suyundan farklı fizyolojik etkilere sahip biyoaktif peptitlerin üretim potansiyelinin bulunduğu açıkça görülmektedir. Bu çerçevede, yapılan bu çalışmada peynir altı suyunun probiyotik özellik gösteren laktik asit bakterileri ile fermente edilerek ve bitkisel kaynaklı proteolitik enzimler yoluyla hidroliz edilerek biyoaktif peptitlerce zengin peynir altı suyunun üretilme potansiyelinin araştırılması düşünülmüştür.

### 3. MATERİYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Projede kullanılan peynir altı suyu, Uşak'da peynir altı suyu tozu üretimi yapan Uşak Süt A. Ş. firmasından pastörize şekilde temin edilip bölüm laboratuvarına getirilmiştir. Bu şekilde temin edilen peynir altı suyu fermentasyon ve enzimatik hidrolizasyon işlemleri için kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve standart maddeler analitik /kromotografik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma–Aldrich (St Louis, ABD)'den satın alınmıştır. Mikrobiyel fermentasyon için kullanılan *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhomnosus* saf kültürleri freeze dry şeklinde Chr. Hansen (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiş olup mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri Lab M (Lancashire-İngiltere) ve Sigma-Aldrich (St Louis, ABD) firmalarından satın alınmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Peynir Altı Suyunun Pastörizasyonu

Uşak Süt A.Ş. firmasından temin edilen peynir altı suyu'nun pastörizasyonu işletmede bulunan plakalı ısı değiştirici sistem (Resim 3.1) ile çok yüksek sıcaklık pastörizasyon normları olan 85 °C'de 15-30 sn şeklinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra peynir altı suyu steril edilmiş 2 L'lik kapaklı cam şişelere konularak bölüm laboratuvarına getirilmiştir. 2 L'lik şişelerde bulunan peynir altı suları hızlıca mikrobiyal fermentasyon ve enzimatik hidrolizasyon işlemlerine alınmıştır.

##### 3.2.2. Peynir Altı Suyunun Probiyotik Bakteriler ile Fermentasyonu

Pastörize peynir altı suyu, 500 mL'lik schott şişelerde 6 eş kısma aseptik şekilde ayrılmıştır (Resim 3.2). Bu şekilde ayrılan peynir altı suları, McFarland standartlarıyla ayarlanmış *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* bakteri solüsyonları ile yaklaşık 6 log düzeyinde inoküle edilmiştir. İnoküasyondan sonra peynir altı suları 37 °C'de 16-20 saat inkübasyona bırakılarak fermente edilmiştir. Fermentasyon, *Lactobacillus acidophilus* için mikroaerobik olarak 150 rpm karıştırma hızında, *Lactobacillus rhomnosus* ise anaerobik olarak inkübatörde gerçekleştirilmiştir (DAIHAN, IS-30, Güney Kore).

Fermentasyonun 6., 12. ve 24. saatlerinde peynir altı suyu örnekleri alınarak biyokimyasal ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.1. Plakalı ısı değiştirici



Resim 3.2. Aseptik şekilde 6 eşit parçaya ayrılmış peynir altı suyu

### 3.2.3. Bitkisel Ham Enzim Ekstraktların Hazırlanması

Peynir altı sularının enzimatik hidrolizi için ananas, enginar ve kavun kabuklarından ultra saf su ile elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılmıştır. Söz konusu ham enzim ekstraktlarının elde edilmesinde Konrad vd. (2014)'nin önerdiği metot modifiye edilmiştir. Bu amaçla, ananas, enginar ve kavun kabukları etüde 50 °C'de 3-5 gün kurutulurak

laboratuvar tipi blendardan geçirilmiştir. Daha sonra toz haline gelen kabuklardan 25 g tartılarak 250 mL ultra saf su kullanılarak cam şişelere aktarılmıştır. Cam şişeler, oda sıcaklığında 150 rpm’de 24 saat çalkalanmış ve ham ekstraktlar bir tülbentten süzülerek 250 mL’lik beherlere alınmıştır (Resim 3.3). Beher içerisinde bulunan ekstraktlara %30 doygunluğa ulaşana kadar amonyum sülfat + 4 °C’de eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra ekstraktlar 4000 rpm’de 20 dakika boyunca santrifüj (Lab 312, Türkiye) edilmiştir. Santrifüj sonunda berrak supernatant süzölmüş ve kalıntı kısma tekrar 30 mL ultra saf su eklenmiştir. Saf su eklenen ekstraktlar diyaliz membranına (Spectrum, Spectra/Por 1 Dialysis Tubing, 6-8 kD MWCO) alınarak saf suya karşı + 4 °C’de 24 saat boyunca diyalizi gerçekleştirilmiştir. Ham ekstraktlarda, ananastan sistein proteazların (örn; bromelain), kavundan serin proteazların (örn; cucumisin) ve enginar kabuğundan aspartik proteazların (örn; cynarase) elde edildiği düşünölmüştür.



Resim 3.3. Ananas, enginar ve kavun kabukları ve ham ekstraktlar

#### 3.2.4. Peynir Altı Suyunun Enzimatik Hidrolizi

Peynir altı suyunun enzimatik hidrolizi için ananas, kavun ve enginardan elde edilen ham sıvı ekstraktlar kullanılmıştır. Peynir altı sularının hidrolizasyonu mikrobiyolojik fermentasyonda olduğu gibi 6 eşit kısma ayrılmış (250 mL) ve pH’ları süt pH’sı olan 6,68’e 0,1 N steril NaOH ile ayarlanmıştır. Daha sonra peynir altı sularına izole edilen ham enzim ekstraktlarından 10 mL ilave edilerek hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidrolizasyon 37 °C’de, 150 rpm karıştırma hızında 24 saat sürdürölmüştür. Hidroliz süresince 6., 12. ve 24. saatlerde peynir altı suyu örneklerinden numuneler alınarak hızlıca 5 °C’ye soğutulmuştur. Hemen analiz yapılmayacak örnekler -30 °C’de saklanmıştır.

### **3.2.5. Kimyasal Analizler**

#### **3.2.5.1. Genel Kompozisyon**

Çalışmada kullanılan peynir altı suyunun pH analizi, kurumadde, ve kül tayini Bradley vd., (1992)' a göre yapılmıştır. Örneklerin protein miktarı Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir (Bradley vd., 1992).

#### **3.2.5.2. İzole Edilen Ham Enzim Ekstraktlarında Preteolitik Aktivitenin Ölçülmesi**

Ananas, kavun ve enginarından izole edilen enzimlerin proteolitik aktiviteleri spektrofometrik olarak Konrad vd. (2014)' e göre yapılmıştır. Bu metotta spesifik olmayan proteaz aktivitesi, kazein'in substrat olarak kullanılmasıyla belirlenmektedir. Buna göre, bir cam tüp içerisindeki 5 mL %0.65'lik kazein çözeltisine 1 mL ham enzim ekstraktı ilave edilmiş ve 37 °C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, tüp içerisine 5 mL 110 mM trikloroasetik asit (TCA) çözelti ilave edilmiştir. Daha sonra karışım 37 °C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışım 0.45 µm PTFE filtreden geçirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan çözülden başka bir tüpe 2 mL konularak üzerine 5 mL 50mM'lık sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ve 1 mL 0.2 N Folin Ciocalteu's çözelti ilave edilerek tekrar 37 °C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 660 nm'de absorbansı köre karşı okunmuştur. Bitkisel ham enzim ekstraktlarının proteolitik aktivitesi daha önceden oluşturulmuş tirozin grafiği (EK1) yardımıyla UI/mL enzim ekstraktı olarak belirlenmiştir.

#### **3.2.5.3. Jel Elektroforez Yöntemiyle Hidroliz Düzeyinin Belirlenmesi**

Fermente ve hidroliz edilen peynir altı suyu proteinlerinin hidroliz düzeylerinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç için Biorad firmasından Tris-Tricine Precast Gel (16,5% 1,5–30 kD) temin edilmiştir. Fermentasyon ve enzimatik yollarla hidroliz edilen peynir altı suları öncelikle 15 mL'lik falkon tüplerine alınarak 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilmiş ve santrifüj edilen numunelerin orta kısmından 50 µL örnek eppendorf tüplerine alınarak 50 µL ultra saf su ile seyreltilmiştir. Daha sonra, eppendorf tüpünün içerisine 25 µL tricine örnek tamponu (200 mM Tris-HCl, pH 6,8, % 2 sodyum dodesil sulfat - SDS, %40 gliserol, %0,04 Coomassie Brilliant Blue G-250, 2% β-mercaptoethanol, Biorad, ABD) eklenerek 15 dk vorteks uygulanmıştır. Hazırlanan örnekler 95 °C'deki su banyosunda 6,5 dk bekletilerek protein denaturasyonu

gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE Elektroforez ünitesine yerleştirilen jel kuyucuğuna her biri 14 µL olacak şekilde numuneler ve protein standardı (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (2-250 kD, Biorad-ABD) yüklenmiştir. Numuneler, 60 V’da 10 dk, 80 V’da 125 dk buffer ortamında (10xTris/Tricine/SDS buffer, Biorad-ABD) jelde yürütülmüştür. Elde edilen jellerin asetik asitte 20-30 dk fiksasyonu, %0,1’lik Coomassive Blue R250 boya çözeltisi içerisinde 20 dk boyaması ve çalkalayıcı üzerinde 24 saat süreyle metanol + asetik asit çözeltisinde yıkaması yapılarak protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra, jellerin görüntüleri UV Transilluminatör’e alınarak fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra jel fotoğraflarının Gel Analyser 2010 (Freeware, from Dr. Istvan Lazar) jel görüntüleme paket programıyla protein bantlarının yoğunlukları belirlenmiştir.

### **3.2.6. Mikrobiyolojik Analizler**

#### **3.2.6.1. Probiyotik Bakterilerin Sayımı**

Peynir altı suyunun fermentasyonu sırasında probiyotik mikroorganizmaların mikrobiyel gelişimlerini izlemek için mikrobiyolojik sayımları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; *L. acidophilus* sayımı için modifiye MRS-Agar besiyeri (1,5 g/l safra tuzları içeren), *L. rhamnosus* sayımı için modifiye MRS-Agar (%0,04 g bromkrosol yeşil) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlar hazırlanarak söz konusu bakterilerin dökme plak yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler *L. acidophilus* için mikroaerofilik, *L. rhamnosus* için anaerobik koşullarda 37°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmış ve sayımları gerçekleştirilmiştir (Dave ve Shah, 1996; Kailasapathy vd. 2008).

### **3.2.7. Peynir Altı Suyunun Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.7.1. Antimikrobiyel Aktivite Tayini**

Fermentasyon ve enzimatik yolla hidroliz edilen peynir altı sularında antimikrobiyel aktivite disk difüzyon yöntemiyle Cherrat vd., (2013)’e göre gerçekleştirilmiştir. Fermente ve hidrolize peynir altı sularının patojenler üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 6538, *Listeria monocytogenes* 4c RSKK 476, ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 700408 bakteri suşları kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle suşlar Nutrient Broth’da canlandırılmıştır. Canlandırılan bakteri kültürlerinin inokulumlarının hazırlanması için Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife, İtalya) besiyeri kullanılmıştır. Söz konusu bakteri kültürleri ayrı ayrı TSB’ye aktarılarak 37±2°C’de 24 saat inkübe edilmiştir (*L. monocytogenes*

30±2°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.) TSB’de çoğaltılan kültürler aseptik ortamda sanrifiy edilmiş ve serum fizyolojik su ile yıkanmıştır. Bu şekilde hazırlanan kültürler McFarland çözeltisi ile 0,5’e ayarlanmıştır. Daha sonra, 10<sup>8</sup> kob/mL düzeyinde ayarlanan kültür solüsyonları önceden hazırlanıp katılaştırılmış steril Muller Hinton Agar içeren petri kutularına 0,1 mL olacak şekilde (yayma plak yöntemi) ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen besiyerlerinin süspansiyonları emmesi beklendikten sonra steril disklerle (Bioanalyses, Türkiye) aseptik şekilde fermente ve hidrolize peynir altı suyu örnekleri 25 µL emdirilmiş ve diskler steril pens yardımıyla besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda disklerin etrafındaki zonlar dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak spiramycin (100 µg) ve erythromycin (100 µg) antibiyotiklerinin solüsyonları kullanılmıştır.

### **3.2.7.2. Antioksidan Aktivite Tayini**

Fermente ve hidrolize peynir altı sularında antioksidan aktivite iki farklı yöntem ile belirlenmiştir. Bunlar; Benvenuti ve ark., (2004) tarafından önerilen DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi ve Apak ve ark., (2004) tarafından önerilen CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemde de fermentasyon ve enzimatik yolla hidroliz edilen peynir altı suları seyreltme yapılmadan kullanılmıştır. DPPH yönteminde; 5 adet deney tüpüne 250,500,750,1000 ve 1250 µL peynir altı suyu örneği konularak üzerine 600 µL 1mM DPPH radikali ilave edilmiş ve tüplerde toplam hacim 6 mL olacak şekilde metanol eklenmiştir. Numuneler, oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletilmiş ve 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuması gerçekleştirilmiştir. Örneklerin IC<sub>50</sub> değerleri µL ekstrakt olarak ifade edilmiştir. CUPRAC yönteminde ise bir deney tüpüne 1mL 0,01 M bakır klorür (CuCl<sub>2</sub>) çözeltisi, 1mL 7,5x10<sup>-3</sup> M neokuproin, 1 mL pH 7’de amonyum asetat (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) ve 125 µL peynir altı suyu örneği konarak 1 dk. vortekslenmiş ve karanlıkta 30 dk. bekletilmiştir. Daha sonra numunelerin, 450 nm’de şahit örneğe karşı okuması gerçekleştirilmiştir. Örneklerin CUPRAC sonuçları trolox ile çizilen standart eğri yardımıyla hesaplanmıştır (EK 2).

### **3.2.7.3. Angiotensin-Converting Enzim (ACE) İnhibitör Aktivitesi Tayini**

Fermente ve hidrolize peynir altı sularının ACE inhibitör aktiviteleri Cushman and Cheung (1971) tarafından geliştirilen ve ACE enziminin hippuril-L-histidil-L-lösin (HHL)



substrat olarak kullanılarak hipürük asit ve histidil-lösin'e parçalaması ve parçalanma ürünü olan hipürük asidin 228 nm dalga boyunda absorbasının ölçülmesi prensibine dayanan spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. ACE inhibitör aktivitesinin ölçülmesinde fermente ve hidrolize peynir altı suyu numuneleri doğrudan kullanılmış olup Şanlı ve ark., (2018) metot koşulları takip edilmiştir.

### 3.2.8. İstatistiksel Analizler

Çalışmada fermente ve hidrolize peynir altı sularının kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerindeki değişimleri belirlemek amacıyla çift yönlü (two-way ANOVA) varyans analizi tekniği kullanılmıştır. İstatistiksel olarak önemli olan farklılıkların karşılaştırılması amacıyla TUKEY çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. İstatistiksel analizlerde kullanılan model eşitlik 1'de verilmiştir (Sheskin, 2004). Tüm istatistiksel analizlerin yapılmasında SPSS for Windows (version 20.0), Minitab (version 16) paket programları kullanılmıştır.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk} \quad \text{Eşitlik 1}$$

Burada;  $Y_{ijk}$ : i örneğinin j fermente/hidroliz süresindeki k deneyinin değeri,  $\alpha_i$ : örnek çeşidinin etkisini ( $i=1, 2, 3, 4, 5$ ),  $\beta_j$ : fermentasyon/hidroliz süresinin etkisini ( $j=1, 2, 3$ ),  $e_{ij}$ : rastgele hata terimini göstermektedir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Genel Kompozisyon

Çalışmada kullanılan peynir altı suyu'nun kurumadde ve protein miktarı, temin edildiği işletmede ultrafiltrasyon yoluyla % süt bileşimine yakın olacak şekilde (~10 Bx°, ve ~%3 protein) ayarlanmıştır. Genel bileşimin belirlenmesi için yapılan analizlerde, peynir altı suyunun kurumadde, asitlik (pH), protein ve kül miktarı sırasıyla %8,06, 7,1 pH, %2,10 ve %1,16 olarak belirlenmiş olup literatürde peynir yapımı sonucu çıkan ve hiçbir işlem görmemiş peynir altı suyunun bileşiminden biraz daha yüksek değerlere sahiptir.

### 4.2. Ham Enzim Ekstraktlarının Proteolitik Aktiviteleri

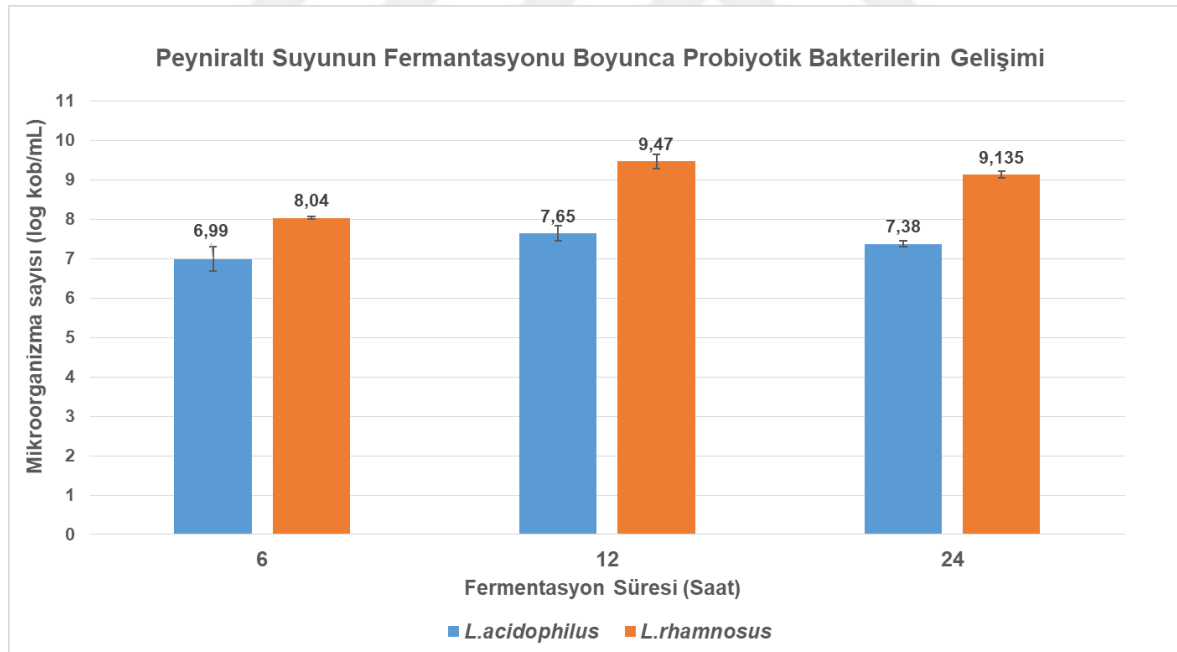
Bitkisel ham enzim ekstraktlarının proteolitik aktivite değerleri hakkında bilgi sahibi olabilmek için spesifik olmayan proteaz aktivitesi, kazeinden tirozin salınımının ölçülmesine dayanan spektrofometrik yöntem ile belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda, ananas, kavun ve enginar kabuklarından elde edilen enzim ekstraktlarının proteolitik enzim aktiviteleri sırasıyla 5,066, 4,921 ve 5,514 UI/mL enzim ekstraktı olarak belirlenmiştir. Buna göre; enginardan elde edilen ham enzim ekstraktının proteolitik aktivitesinin diğer ekstraktlara göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Ancak söz konusu yüksek proteolitik aktivite daha sonra tartışılacak olan SDS-PAGE analizlerinde doğrulanamamıştır. SDS-PAGE analizlerinde kavundan elde edilen ham enzim ekstraktının peynir altı suyu proteinlerini parçalamasının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, analizde substrat olarak kazein proteininin kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü, proteinlerin yapısal düzeninden ve protein-enzim arasındaki etkileşimlerden enzim aktivitesinin etkilendiği bilinmektedir.

Yapılan çalışmalarda, bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimlerin aktiviteleri farklı yöntemlerle belirlenmiştir ve değişkenlik göstermektedir. Lestari ve Suayta (2019), yaptıkları bir çalışmada ananas kabuklarından elde ettikleri bromelian ham ekstraktının proteolitik aktivitesini 55°C'de 8,333 UI/mL enzim ekstraktı olarak belirlemişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Esposito ve ark., 2016), enginar kabukları ve alp devedikeni çiçeğinden elde edilen aspartik proteaz enzim ekstraktlarının toplam enzim pıhtılaştırma aktivitelerini (enzyme clotting activity) 9,26 U ve 320,24 U olarak belirlemişlerdir. Mazorra-Manzano ve

ark., (2013) kiwi, kavun ve zencefil'den elde ettikleri sulu enzim ekstraktlarının sütü pıhtılaştırma aktiviteleri ile sığır serum albümin ve kazein üzerindeki proteolitik aktivitelerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, kiwi, kavun ve zencefil'den elde edilen enzim ekstraktlarının sığır serum albümin üzerindeki proteolitik aktivitelerini sırasıyla 0,09, 0,11, ve 0,37 U/mg belirlerken, kazein albümin üzerindeki proteolitik aktivitelerini ise sırasıyla 0,55, 0,73 ve 0,90 U/mg olarak tespit etmişlerdir.

#### 4.3. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularında Probiyotik Bakterilerin Gelişimleri

*L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* ile fermente edilen peynir altı sularında 24 saat'lik fermentasyon süresince oluşan mikrobiyel gelişimler şekil 4.1'de gösterilmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde, her iki probiyotik bakterinin sayısının 6 log kob/mL düzeyinden aşağıya düşmediği ve fermentasyon süresince *L. acidophilus* sayısında ortalama 0,39 log kob/mL düzeyinde, *L. rhamnosus*'da ise 1,09 log kob/mL düzeyinde bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Fermentasyon süresince probiyotik bakterilerin peynir altı suyundaki mikrobiyel gelişimleri

Probiyotik bakterilerin peynir altı suyundaki mikrobiyel gelişimlerinden elde ettiğimiz bulgular yapılan bazı çalışmalarla benzerdir (Pescuma ve ark., 2008; Virtanen ve ark., 2007).

Pescuma ve ark., (2017) yaptıkları bir çalışmada, termofilik laktik asit bakterileri olan *Streptococcus thermophilus* CRL 804, *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 kullanılarak fermente edilen rekonstitüye peynir altı suyu tozunun fonksiyonel içecek üretim potansiyelini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, *L. acidophilus* CRL 636'nın hem 37 °C hem de 42 °C'de 24 saat fermentasyon süresince mikrobiyel gelişiminin ortalama 2,5 log olduğu ve fermentasyon süresince peynir altı suyundaki  $\alpha$ -laktalbumin'in parçalanmasının  $\beta$ -laktoglobulinden (2,3 - 3,4 kat) daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Süt endüstrisinde kullanılan çeşitli starter kültürlerle fermente edilen sütlerdeki mikrobiyel gelişim ve antioksidan aktivitenin incelendiği bir çalışmada (Virtanen ve ark., 2007), yağsız sütün *L. acidophilus* ile 24 saatlik fermentasyonu süresince *L. acidophilus*'un hücre sayısında 4 log'luk bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir.

#### **4.4. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının Antioksidan Aktiviteleri**

Oksidatif stress, oksijen ve azot reaktiflerinin üretim miktarının artması ve vücudumuzdaki endojen antioksidan mekanizmasının yetersiz kalması ile oluşmaktadır. Oksidatif stress, vücudumuzda yaşam boyunca meydana gelebilecek hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine neden olan önemli bir faktördür. Antioksidan maddelerin günlük diyetimizde bulunması vücudumuzdaki endojen antioksidan mekanizmasını güçlendirmektedir. Antioksidan özellikteki bileşenler özellikle meyve-sebze ve bunların ürünlerinde çok fazla bulunmaktadır. Ancak, son yıllarda yapılan birçok çalışmada gıdalarda bulunan proteinlerin çeşitli yollarla hidrolize olması sonucunda da antioksidan özelliğe sahip birçok biyoaktif peptidin salındığı/oluştugu ortaya konmuştur (Mann ve ark., 2019).

Süt ve süt ürünlerinde bulunan antioksidan özellikteki biyoaktif peptitlerin serum proteinlerinden salındığı/oluştugu ve özellikle metiyonin, sistein gibi kükürt içeren amino asitler, tirozin, triptofan, histidin gibi aromatik özelliğe sahip aminoasitler ile lizin içeren peptitlerin antioksidan özelliklerinin olduğu belirtilmektedir. Söz konusu amino asitlerden kükürt içerenler, aktif SH grupları bulundurdıkları için doğrudan radikaller ile etkileşime girebilmektedir. Aromatik yapıdaki aminoasitler ise yapılarındaki hidrojen atomlarını elektron eksikliği bulunan radikallere vererek antioksidan özellik göstermektedirler (Gür ve ark., 2010; Mann ve ark., 2019). Temel olarak antioksidan maddelerin serbest radikaller ile kimyasal reaksiyona girme mekanizmaları çok farklı olabilmektedir (Örn; hidrojen atomu verme, tek elektron verme, metal iyonlarının şelatlanması). Bu nedenle, antioksidan

özelliğindeki bir maddenin antioksidan aktivitesi en az iki farklı metot ile belirlenmelidir (Santos-Sanchez ve ark., 2019). Bu çerçevede, yapılan çalışmada, CUPRAC ve DPPH yöntemleri ile peynir altı sularının antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. DPPH yöntemi; mor renkli DPPH radikalının antioksidanlar tarafından indirgenmesinin 515-517 nm’de spektrofotometrik yöntemle ölçülmesine dayanmaktadır. CUPRAC metodu ise neokuproin’in bakır II ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin, antioksidanlar tarafından bakır(I)-neokuproin’e dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır (Büyüktuncel, 2013; Kırca ve Özkan, 2010).

Yapılan varyans analizi sonucunda fermente ve hidrolize edilmiş peynir altı sularının antioksidan aktivitelerinin, yapılan uygulamanın çeşidine ve süresine bağlı olarak değişim gösterdiği bulunmuştur (uygulama x süre interaksyonu,  $P < 0,05$ ). Fermente ve hidrolize peynir altı sularının antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Fermente ve hidrolize peynir altı sularının antioksidan aktiviteleri

Örnek	EC <sub>50</sub> değeri (µL)±S.S			DPPH değerindeki Değişim (%)
	Fermentasyon/Hidroliz süresi (saat)			
	6	12	24	
<b>Kontrol</b>	1293,44±0,01 <sup>Ba</sup>	1496,40±0,01 <sup>Aa</sup>	1183,82±0,01 <sup>ABa</sup>	(-) 8,47
<i>L. acidophilus</i>	1171,05±195,93 <sup>Ba</sup>	1164,13±148,22 <sup>Aa</sup>	980,93±88,36 <sup>Ba</sup>	(+) 16,20
<i>L.rhamnosus</i>	1543,50±0,01 <sup>AB</sup>	1465,99±0,01 <sup>A</sup>	1567,63±0,01 <sup>A</sup>	(-)1,59
<b>Kavun</b>	1425,57±125,27 <sup>ABa</sup>	1218,58±0,01 <sup>Aa</sup>	841,30±147,90 <sup>Ba</sup>	(+) 40,98
<b>Ananas</b>	1607,67±105,46 <sup>ABa</sup>	1494,99±31,505 <sup>Aab</sup>	740,08±6,97 <sup>Bb</sup>	(+) 53,96
<b>Enginar</b>	1780,26±0,01 <sup>Aa</sup>	1612,32±0,01 <sup>Aab</sup>	1157,01±0,01 <sup>ABb</sup>	(+) 35,0
<i>P değeri: 0,01</i>				
Örnek	CUPRAC (mg Troloks/L Peynir altı suyu)±S.S			CUPRAC değerindeki Değişim (%)
	Fermentasyon/Hidroliz süresi (saat)			
	6	12	24	
<b>Kontrol</b>	112,72±16,94 <sup>ABa</sup>	103,27±4,16 <sup>Ca</sup>	99,66±6,66 <sup>Da</sup>	(-) 0,11
<i>L. acidophilus</i>	108±10,55 <sup>ABb</sup>	228±5,0 <sup>ABa</sup>	487,44±47,22 <sup>Aa</sup>	(+) 351,33
<i>L.rhamnosus</i>	136,88±1,66 <sup>ABa</sup>	165,50±1,94 <sup>BDa</sup>	152,72±10,27 <sup>CDa</sup>	(+) 12,21
<b>Kavun</b>	155,50±5,27 <sup>Ac</sup>	229,11±3,88 <sup>Ab</sup>	332,16±15,27 <sup>Ba</sup>	(+) 113,60
<b>Ananas</b>	108±4,44 <sup>ABb</sup>	195,50±14,72 <sup>ABa</sup>	166,33±9,44 <sup>ACb</sup>	(+) 54
<b>Enginar</b>	85,22±0,1 <sup>Ba</sup>	108,27±2,50 <sup>CDa</sup>	128±1,11 <sup>CDa</sup>	(+) 50,19
<i>P değeri: 0,01</i>				

<sup>A-D</sup> Aynı fermentasyon/hidroliz süresinde farklı büyük harflerle gösterilen uygulamalara ait ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ( $P < 0,05$ ). <sup>a-c</sup> Aynı uygulamaya ait farklı küçük harflerle gösterilen fermentasyon/hidroliz ortalamaları arasında farklar önemlidir ( $P < 0,05$ ). S.S: standart sapma

Peynir altı sularının DPPH yöntemine göre belirlenen antioksidan değerleri incelendiğinde, kontrol grubu ve *L. rhamnosus* ile fermente olan peynir altı suyu örneği hariç

diğer tüm peynir altı sularının EC<sub>50</sub> değerlerinin 24 saat'lik fermentasyon süresince önemli derecede azaldığı (P<0,05), diğer bir deyişle antioksidan aktivite değerlerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle ananas, enginar ve kavun kabuklarından elde edilen ham bitkisel enzim ekstraktlarıyla hidrolize olan peynir altı suyu örneklerinde ortalama %35-53 arasında antioksidan aktivite artışının meydana geldiği tespit edilmiştir. Buna karşın, *L. acidophilus* ile fermente edilmiş peynir altı suyu örneğinin antioksidan aktivite değerinde %16,20 oranında bir artış olduğu, fermente olmamış örnekte ise antioksidan aktivite artışının %8,74 olduğu belirlenmiştir. Buna göre, peynir altı suyunun proteolitik aktiviteye sahip bitkisel ham enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilmesiyle antioksidan biyoaktiviteye sahip biyoaktif peptitlerin oluşumun *Lactobacillus* cinsi probiyotik bakteriler ile fermente edilen peynir altı sularından daha yüksek olduğu söylenebilir. Nitekim, çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak proteolitik aktiviteye sahip bitkisel enzim ekstraktlarıyla peynir altı suyu proteinlerinin hidrolize edildiği çalışmalarda antioksidan aktivitenin arttığı saptanmıştır (Rocha ve ark., 2017; Tavares ve ark., 2011).

Peynir altı sularının CUPRAC yöntemine göre belirlenen antioksidan değerleri incelendiğinde, DPPH yöntemiyle elde edilen bulgulara benzer olarak hidroliz ve fermente edilen peynir altı sularının antioksidan aktivite miktarlarında önemli bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Özellikle *L. acidophilus* ile fermente edilen peynir altı sularında 24 saat'lik fermentasyon sonunda CUPRAC değerinin dolayısıyla antioksidan aktivite değerinin %351 gibi yüksek bir oranda artış gösterdiği bulunmuştur. Diğer taraftan, kavun kabuklarından elde edilen ham enzim ekstraktı ile hidrolize edilen peynir altı sularının diğer enzim ekstraktları ile hidrolize edilen peynir altı sularına göre daha yüksek antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Ananas ve enginardan elde edilen ham enzim ekstraktları ile hidroliz edilen peynir altı sularının 24 saat'lik hidroliz işlemi sonucunda antioksidan aktivite değerlerinin sırasıyla %54 ve %50,19 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir.

24 saat'lik uygulama süresince fermente ve hidrolize peynir altı sularındaki antioksidan aktivite artışı hem CUPRAC hem de DPPH yöntemi ile belirlenmiştir. Buna karşın, peynir altı sularında meydana gelen antioksidan aktivite artışlarının kullanılan yöntemlere göre farklılık göstermesi daha öncede ifade edildiği gibi antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinin farklı prensiplere dayanması ve oluşan antioksidan maddelerin, bu yöntemlerde kullanılan sentetik radikallerle farklı şekillerde etkileşime girmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Rocha ve ark., (2017) yaptıkları bir çalışmada, *Salpichroa organifolia* (vadi zambağı) bitkisinin meyvelerinden elde ettikleri aspartik proteazı serbest ve glutaraldehit agoroz ile immobilize ederek peynir altı suyu protein konsantrantını hidroliz etmişlerdir. Daha sonra elde edilen peynir altı suyu hidrolizatı ultrafiltrasyon işlemiyle 10 kDa'dan büyük, 3-10 kDa arasında ve 3 kDa'dan küçük fraksiyonlarına ayırıp antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, 3 kDa'dan küçük fraksiyonların yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu, peynir altı suyu konsantrantının (hidrolize olmamış) ise en düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, araştırmacılar peynir altı suyu proteinlerinin hidroliz derecesinin artması ile antioksidan aktivitenin arttığını belirlemişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Corrons ve ark., 2012), yalancı portakal ağacı meyvesinin sütünden elde edilen (serin endopeptidaz içeren) ham enzim ekstraktı ile pıhtılaştırılmış sütün elde edilen peynir altı suyunun antioksidan ve ACE inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, ham enzim ekstraktı ile hidrolize edilen peynir altı suyunun antioksidan aktivite değerinin kimozen ile pıhtılaştırılmış sütün peynir altı suyunun antioksidan değerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, söz konusu bitkiden elde edilen enzimin kimozenine alternatif olabileceğini ve biyoaktif peptitlerin üretilmesinde kullanılma potansiyelinin yüksek olduğunu ifade etmişlerdir.

Çok yakın zamanda yapıldığı bir çalışmada (Neto, 2019), *Eupenicillium javanicum* ve *Myceliophthora thermophila* küflerinden elde edilen fungal enzimlerin peynir altı suyunun hidrolizinde kullanılabileceği belirlenmiştir. Çalışmada, her iki küften elde edilen enzimin peynir altı suyu proteinlerini hidroliz etme miktarının % 15-20 arasında olduğu ve DPPH radikalini en yüksek inhibe oranının % 16.21 olarak *M. thermophila*'den elde edilen enzim ile gerçekleşebildiği saptanmıştır. Correa ve ark., (2014) ise koyun sütü peynir altı suyunu *Bacillus* sp. P7 suşundan elde edilen proteaz ile hidroliz ederek antioksidan ve ACE-inhibitör aktivite özelliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, koyun sütü peynir altı suyunun *Bacillus* sp. P7 suşundan elde edilen proteaz ile 6 saat boyunca hidroliz edilmesi ile ABTS radikalinin inhibisyonunu %51.30, Fe<sup>+2</sup> şelatlama aktivitesini ise %38,28 oranında sağladığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, ACE inhibisyon aktivitesinin ise en yüksek % 55,7 oranında 4 saat hidroliz sonucunda sağlandığı bulunmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada (Silvestre ve ark., 2013), pankreatin ve *Aspergillus sojae*'den elde edilen Corolase LAP® enzimi ile hidroliz edilen peynir altı suyundan antioksidan aktiviteleri yüksek biyoaktif peptitlerin üretimi araştırılmıştır. Çalışmada, peynir altı suyunun 8:100 Enzim/Substrat

oranında hem pankreatin hem de Corolase LAP® enzimi ile hidrolizi sonucunda % 60.67 (pirogallol-super oksit yakalama) ve %59.70 (DPPH radikali yakalama) oranlarıyla en yüksek antioksidan aktivitenin olduğu belirlenmiştir. Ancak, araştırmacılar, büyük ölçekte üretimler için maliyetlerin azaltılması açısından Corolase LAP®'nin 2:100 Enzim/Substrat oranında kullanılmasıyla %58,77 hidroksi radikalini ve %47,18 süper oksit radikalini yakalama oranlarının gerçekleştirilebileceğini belirlemişlerdir. Ledesma ve ark., (2005) ise ticari olarak satılan pepsin, tripsin, kimotripsin, termolisin, Corolas PP enzimleri ile saf  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktoglobulin proteinlerinin hidroliz edilmesi ile oluşan protein hidrolizatları ve bu hidrolizatların 3kDa'dan küçük fraksiyonlarının antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, Corolas PP enziminin her iki serum proteininden antioksidan özellikteki biyoaktif peptit üretiminin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Diğer taraftan, araştırmacılar  $\beta$ -laktoglobulin'den elde edilen 3kDa'dan küçük fraksiyonların peptit profillerini LS-MS/MS ile tanımladıklarında sentetik bir antioksidan olan butillendirilmiş hidroksianisol (BHA)'den daha güçlü aktiviteye sahip biyokaktif peptit fraksiyonunun f (9-29) (Trp-Tyr-SerLeu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile) olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular ile literatürdeki bulgular birlikte değerlendirildiğinde, mikrobiyel enzimler ve bitkisel enzim ekstraktlarıyla elde edilen peynir altı suyu hidrolizatlarının antioksidan aktivite sonuçlarının enzimin çeşidi, enzim/substrat oranı ve uygulama süresine bağlı olarak çok değişken olduğu görülmüştür. Ayrıca, daha önceden de ifade edildiği gibi antioksidan aktivitenin belirlenmesi için kullanılan metotlara ait prensiplerin farklı olması da çalışmalarda belirlenen antioksidan değerlerinde farklılıkların olmasını sağlamaktadır. Genel olarak, peynir altı suyu proteinlerinin farklı enzim çeşitleriyle hidroliz edilmesinin veya farklı mikroorganizmalarla fermentasyona tabi tutulmasının antioksidan aktivitenin artmasına neden olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, hidroliz edilmiş peynir altı suyu hidrolizatlarının özellikle 3 kDa-10kDa arasındaki fraksiyonlarının antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu ve bu nedenle hidroliz miktarının artmasına paralel olarak antioksidan aktivite miktarının arttığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir.

#### **4.5. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının ACE İnhibitör Aktiviteleri**

Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE, EC. 3.4.15.1) bir dipeptil karboksipeptidaz olup Renin-Anjiotensin-Aldosteron biyolojik sisteminde yer almaktadır. Temel olarak, kan



basıncının ayarlanmasında görevlidir. ACE enziminin kan basıncını yükseltmesi iki şekilde olmaktadır. Birinci olarak, enzim Anjiotensinojenin renin ile hidroliziyle oluşan ve inaktif halde olan Anjiotensin I'i Anjiotensin II'ye dönüştürmektedir. Anjiotensin II, damar daraltıcı özelliğiyle kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır. İkinci olarak ise, ACE enzimi damar genişletici bradikininin parçalanmasını sağlamakta ve adrenal korteksten aldosteronun salgılanmasını teşvik etmektedir. Bu durumda kan basıncının yükselmesi gerçekleşmektedir (Kancabaş, 2010; Pihlanto-Leppälä, 2001). ACE inhibitör peptitler ACE'yi inaktif hale getirerek kan basıncını/tansiyon düşürücü etki gösterirler. Gıda ürünleri içerisinde, süt ve süt ürünleri kaynaklı birçok biyoaktif peptidin özellikle ACE inhibitör etkisinin olduğu yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Chen ve ark., 2015; Guo ve ark., 2019; Ibrahim ve ark., 2017; Perez ve ark., 2019; Pereira ve ark., 2019; Villadoniga ve ark., 2018). Süt ve süt ürünlerinde ACE inhibitör aktivitesine sahip biyoaktif peptitlerin oluşumunun kazein proteini ve serum fazında bulunan  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin proteinlerinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Pihlanto-Leppälä, 2001). Yapılan bu çalışmada fermente ve hidrolize peynir altı sularının 24 saat süresince ACE inhibitör aktivitesi, ACE enziminin hippuril-L-histidil-L-lösin (HHL) hipürik asit ve histidil-lösin'e parçalaması prensibine dayalı spektrofotometrik yöntem ile izlenmiştir. Çizelge 4.2'de fermente ve hidrolize peynir altı sularının ACE inhibitör aktiviteleri gösterilmiştir.

Yapılan varyans analizi sonucunda fermente ve hidrolize edilmiş peynir altı sularının ACE inhibitör aktivitelerinin yapılan uygulamanın çeşidine ve süresine bağlı olarak değişim gösterdiği bulunmuştur (uygulama x süre interaksyonu,  $P < 0,05$ ). Buna göre; kontrol grubu (fermente/hidroliz olmayan peynir altı suyu) hariç hem probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilen hem de ham bitkisel enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilen peynir altı sularının 24 saat'lik uygulama süresince ACE inhibitör aktivitelerinde önemli bir artışın meydana geldiği tespit edilmiştir. Fermentasyon uygulaması ele alındığında; 24 saatlik fermentasyon sonunda *L. acidophilus* ile fermente olan peynir altı sularının ACE inhibitör aktivitesinin *L. rhamnosus* ile fermente olan peynir altı sularından daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Hidroliz uygulaması incelendiğinde; 24 saat sonunda kavundan elde edilen ham enzim ekstraktı ile hidroliz edilen peynir altı sularının ACE inhibitör aktivitesinin ananas ve kavundan elde edilen ham enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilen peynir altı sularından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tüm peynir altı suyu örneklerinin 6-24 saatlik hidroliz ve

fermentasyon süreleri göz önünde bulundurulduğunda ise ACE inhibitör aktivitesindeki artışın en yüksek 6,48 kat ve 3,29 kat olarak sırasıyla *L. rhamnosus* ile fermente edilen ve enginardan elde edilen ham enzim ekstraktı ile hidroliz edilen peynir altı sularında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Peynir altı sularındaki ACE inhibitör aktivitesi artışının hem probiyotik bakterilerle fermentasyon hem de bitkisel ham enzim ekstraktları ile hidroliz sonucunda oluşan biyoaktif peptitler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.2. Fermente ve hidrolize peynir altı sularının ACE inhibitör aktiviteleri

Örnek	ACE İnhibitör Aktivite (%) ± S.S			ACE İnhibitör Aktivitesindeki Değişim (kat)
	Fermentasyon/Hidroliz süresi (saat)			
	6	12	24	
<b>Kontrol</b>	24,07±0,01 <sup>Db</sup>	43,05±0,01 <sup>Ba</sup>	28,70±0,01 <sup>Db</sup>	1,19
<b><i>L. acidophilus</i></b>	48,18±0,01 <sup>Ab</sup>	31,48±0,46 <sup>Cc</sup>	97,22±0,01 <sup>Aa</sup>	2,02
<b><i>L.rhamnosus</i></b>	10,64±0,01 <sup>Ec</sup>	17,12±0,01 <sup>Db</sup>	68,98±0,01 <sup>Ca</sup>	6,48
<b>Kavun</b>	40,24±3,74 <sup>Bb</sup>	34,49±1,62 <sup>Cc</sup>	85,18±0,01 <sup>Ba</sup>	2,11
<b>Ananas</b>	37,50±0,01 <sup>Bb</sup>	65,74±0,01 <sup>Aa</sup>	69,44±0,01 <sup>Ca</sup>	1,85
<b>Enginar</b>	22,22±0,01 <sup>Cb</sup>	14,81±0,01 <sup>Dc</sup>	73,14±0,01 <sup>Ca</sup>	3,29

*P değeri:* 0,01

<sup>A-D</sup>Aynı fermentasyon/hidroliz süresinde farklı büyük harflerle gösterilen uygulamalara ait ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05). <sup>a-c</sup>Aynı uygulamaya ait farklı küçük harflerle gösterilen fermentasyon/hidroliz ortalamaları arasında farklar önemlidir(P<0,05). S.S: standart sapma

Çalışmamızda elde edilen bulgulara benzer olarak, literatürde peynir altı suyu proteinlerinin enzimatik hidroliz, mikrobiyel fermentasyon, ısıl işlem gibi farklı uygulamalar sonucunda ACE inhibitör aktivitesinin yükseldiği veya ACE inhibitör özelliğine sahip biyoaktif peptitlerin salındığına/oluştığına ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Tavares ve ark., 2011). Bu çerçevede, Tavares ve ark., (2011) ticari olarak temin edilebilen yabani enginar ekstraktı kullanarak peynir altı suyu konsantratından antioksidan ve ACE inhibitör aktiviteleri yüksek peptitlerin eldesini yüzey yanıt metoduyla optimize etmişlerdir. Çalışmada; peynir altı suyu konsantratu ve saf  $\alpha$ -laktalbumin solüsyonunun pH 7'de 55 °C'de 7 saat boyunca enzim substrat oranı 1/6 olacak şekilde optimum koşullarda hidrolize edilmesiyle ACE inhibitör aktivitelerinin sırasıyla 105.4  $\mu$ g/mL ve 47.6  $\mu$ g/mL (IC<sub>50</sub> değeri) olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, optimum koşullarda hidrolize edilen peynir altı suyu konsantratındaki ACE inhibitör aktivesine sahip peptit fraksiyonlarının çoğunlukla  $\alpha$ -laktalbuminden salınan f(16-426), f(32-40), f(10-15), f(97-103), f(97-104), f(98-104) fraksiyonlardan oluştuğu tanımlanmıştır. Yapılan diğer bir

çalışmada (Pérez ve ark., 2019) ise enkapsüle *Bacillus subtilis* ile peynir altı suyu konsantratu hidrolize edilmiş ve hidrolize peynir altı suyu konsantratında bulunan antihipertansif ve antioksidan özellikteki peptitler incelenmiştir. Çalışma sonucunda, peynir altı suyu konsantratının 6 saat boyunca 50 °C’de enkapsüle *Bacillus subtilis* ile hidrolizasyon işlemi sonucunda peynir altı suyu proteinlerinin yaklaşık % 40’nın hidroliz olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, enkapsüle *Bacillus subtilis* ile hidrolize edilmiş peynir altı suyu konsantratında bulunan 3-11 kDA arası ve 3 kDA’dan küçük molekül ağırlığındaki peptit fraksiyonlarının ACE inhibitör aktivitelerini sırasıyla % 82.33 ve % 63.37 bulurken, serbest hücrelerle hidrolize edilmiş peynir altı suyu konsantratının aynı molekül ağırlığına sahip peptit fraksiyonlarında ise ACE inhibitör aktivitelerini sırasıyla %68,89 ve %23.75 olarak belirlemişlerdir. Çalışmada, enkapsülasyon işleminin peynir altı suyu proteinlerinin hidroliz miktarının serbest hücreler ile yapılan hidroliz miktarıyla benzer olduğu belirlenirken, enkapsülasyon işleminin neden ACE inhibitör aktivitesini yükselttiğine dair önemli bir bilgi araştırmacılar tarafından verilmemiştir. Keçi sütünden elde edilen peynir altı suyu tozunun içecek üretiminde kullanılmasının araştırıldığı bir çalışmada (Pereria ve ark., 2019) ise fermentasyonda *L. casei* BGP93 co-kültürü kullanılarak üretilen peynir altı suyu içeceklerinin %96,79 ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Keçi sütü peynir altı suyunun farklı süt ve süt ürünlerinden izole edilmiş mikrobiyel flora ile fermente edilmesi ve fermente peynir altı suyunun proteoliz ve ACE inhibitör aktivitesinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada (Hamme ve ark., 2009), Bamaou des Pyrenee peynirinden ekstrakte edilen mikroflora ile peynir altı suyunun hidrolizasyonu sonucunda  $\alpha$ -laktalbumin’in % 99,6’sının,  $\beta$ -laktoglobulin’in ise % 7,6’sının hidrolize olduğu ve hidroliz işlemi sonucunda ACE inhibitör aktivitesinin %61,2 olduğu saptanmıştır. Bamaou des Pyrenee peynirinden ekstrakte edilen mikrofloranın ise taksonomik olarak *Kluyveromyces marxianus* ve *Lactobacillus rhamnosus* olduğu tanımlanmıştır.

Lacroix ve ark., (2016) yaptıkları bir çalışmada ticari Thermoase PC10F, Peptidase R, and ProteAX ve Accelerzyme® enzimlerini kullanarak peynir altı suyu izolatından elde edilen hidrolizatların ACE ile Dipeptil-Peptidaz IV (DPP-IV) inhibitör aktivitesini incelemişlerdir. Araştırmacılar, öncelikle peynir altı suyu izolatını Thermoase PC10F enzimi ile hidrolize etmişler ve hidrolize olan peynir altı suyu izolatının supernant kısmını Peptidase R, and ProteAX ve Accelerzyme® enzimleri ile her bir enzim için optimum çalışma koşullarında tekrardan hidrolize uğratmışlardır. ACE inhibitör aktivite gösteren peynir altı

suyu hidrolizatlarının sıralaması en yüksekten en düşüğe doğru Thermoase PC10F > Accelerzyme®, Peptidase R > ProteAX şeklinde belirlenmiştir. Diğer taraftan, Accelerzyme® ile hidrolizasyonu yapılan peynir altı suyu izolatının boyut dışlama kromatografisinden (size exclusion) elde edilen yedi fraksiyonundan molekül ağırlığı 645–1065 Da olan 4. fraksiyonunun tüm örnekler içerisinde en yüksek ACE (% 77) ve DPP-IV (% 47) inhibitör aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Söz konusu fraksiyonda ACE ve DPP-IV inhibitör aktivitesine sahip olarak tanımlanan 80 peptidin  $\beta$ -laktoglobulin'den ve 27 tanesinin ise  $\alpha$ -laktalbumin'den salındığı/oluştugu tespit edilmiştir. Peynir altı suyu izolatının ACE inhibitör aktivitesi üzerine yapılan diğer bir çalışmada (Costa ve ark., 2007) ısı işlem ve enzimatik hidroliz uygulamalarının ACE inhibitör aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda, en yüksek ACE inhibitör aktivitesi, peynir altı suyunun 65 °C'de 15 dk. ısı işlemi ile birlikte  $\alpha$ -kimotripsin enzimi uygulanarak elde edilen hidrolize peynir altı suyu izolatında belirlenmiştir. Yapılan SDS-PAGE analizinde, söz konusu uygulama ile  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktoglobulin'in ortalama molekül ağırlıkları 5.7 kDa ve 4.2 kDa olan iki peptit fraksiyonuna tamamen parçalandığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, spontan hipertansif sıçanlarda yapılan besleme çalışmalarında 65 °C'de 15 dk. ısı işlemi ile birlikte  $\alpha$ -kimotripsin enzimi uygulanarak elde edilen hidrolize peynir altı suyu izolatının ağız yoluyla alınmasıyla kan basıncının önemli derece düşmediği, bunun yerine özellikle 65 °C'de 15 dk. ısı işlemi ve alkalaz enzimi ile hidroliz olan peynir altı suyu izolatu ve hidrolize olmamış peynir altı suyu izolatının ağız yoluyla alınmasının farelerde kan basıncını önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu durumun, kimotripsin enzimi uygulanarak elde edilen hidrolize peynir altı suyu izolatında oluşan biyoaktif peptitlerin gastrointestinal enzimlerle etkileşime girmesinden dolayı olabileceğini ifade etmişlerdir. Nitekim,  $\alpha$ -kimotripsin enzimi uygulanarak elde edilen hidrolize peynir altı suyu izolatının intraperitoneal enjeksiyon (gastrointestinal parçalanma oluşmaksızın) yoluyla sıçanlara verildiğinde kan basıncını önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir.

Literatürde, ACE inhibitör aktivitesi seviyesinin % 70-90 arasında olmasının genellikle yüksek olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Perez ve ark., 2019). Buna göre; 24 saat fermente veya hidrolize edilen peynir altı sularının ACE inhibitör aktivitesinin yüksek olduğu söylenebilir. Özellikle *L. acidophilus* ile fermente edilmiş peynir altı suyu örneklerinin % 97 gibi yüksek oranda ACE inhibitor aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu örneği, %85 ile kavundan elde edilen ham enzim ekstraktı ile hidrolize edilmiş

peynir altı suyu örneği takip etmiştir. Örnekler arasındaki ACE inhibitör aktivite farklılıklarının proteoliz seviyelerin farklı olmasından ve kullanılan enzim ve mikroorganizma çeşidinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmadan elde edilen ACE inhibitör aktivitelere ait bulguların literatürdeki bulgularla uyumlu olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, hem bitkisel ham enzim ekstraktları hem de farklı probiyotik bakteri suşları kullanılarak peynir altı suyunun ACE inhibitör aktivitesinin artırılacağı ve peynir altı suyundan terapötik özellikte farklı ürünlerin üretilebileceği düşünülmektedir.

#### **4.6. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının Antimikrobiyel Aktiviteleri**

Hidroliz sonucu oluşan peptitlerin antimikrobiyel etki mekanizmaları tam aydınlatılmamış olmakla beraber bakteriyel membrandaki anyonik lipidlerin pozitif yüklerin etkisiyle stabilizasyonunun bozulduğu ve membran yapısının parçalanmamasına neden olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan, katyonik peptitlerin, hücre dışındaki potasyum ( $K^+$ ) geçirgenliğini artıracak şekilde membranın polarize olduğunu veya geçirgenliğini değiştirdiği ifade edilmektedir. Söz konusu hipoteze karşı  $\alpha$ -laktalbuminden salınan hem anyonik ve katyonik peptitlerin sadece gram pozitif bakterilere etki ettiği ifade edilmektedir. Bu nedenle, peptitlerin yük ve hidrofobite özelliklerinin yanında bilinmeyen fizikokimyasal etkilerinin olduğu da bildirilmektedir (Elbarbary ve ark., 2019; Pellegrini ve ark., 2001; Yeaman ve Yount, 2003).

Çalışmada, fermente ve hidrolize edilmiş peynir altı sularının antimikrobiyel aktivitelerinin ölçülmesi disk difüzyon yöntemi ile yapılmış olup 2'şer adet gram pozitif ve gram negatif özellikteki patojen bakteri suşlarına karşı ölçülmüştür. Çizelge 4.3'de peynir altı sularının antimikrobiyel aktiviteleri gösterilmiştir.

Yapılan antimikrobiyel testler sonucunda hem probiyotik bakteriler ile fermente edilmiş hem de ham bitkisel enzim ekstraktları ile hidrolize edilmiş peynir altı sularının test edilen patojen bakterilere karşı mikrobiyel inhibisyon sağlamadığı belirlenmiştir. Ancak, pozitif kontroller olan spiramycin ve erythromycin antibiyotiklerinin patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyel inhibisyon gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Buna göre, spiramycin'in gram pozitif bakterilere etkisinin daha fazla olduğu, erythromycin'in ise en fazla inhibisyon gösterdiği patojen bakterinin gram pozitif olan *S. aureus* olduğu, bununla beraber *S. enterica* ve *L. monocytogenes* suşlarına ise benzer inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir

Çalışmamızda elde edilen bulgulardan farklı olarak literatürde peynir altı suyu proteinlerinden olan  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin ve laktoferrin'in pepsin, tripsin, proteinaz K gibi proteolitik enzimlerle hidrolizi sonucunda antibakteriyel ve antiviral özellikte peptitlerin oluştuğu rapor edilmiştir (Brandelli ve ark., 2015; Mohanty ve ark., 2016; Salami ve ark., 2010).

Çizelge 4.3. Fermente ve hidrolize peynir altı sularının antimikrobiyel aktiviteleri

Örnek	İnhibisyon Zonu (mm)± S.S			
	Patojen Mikroorganizmalar			
	<i>E. coli</i> ATTC 25922 (-)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 700408 (-)	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (+)	<i>L.monocytogenes</i> 4c RSKK 476 (+)
<b>Spiramycin</b>	11,40±0,15	8,92±0,04	35,66±0,77	34,62±0,39
<b>Erythromycin</b>	20,75±1,62	15,21±0,64	37,37±1,08	13,36±0,28
<b>Kontrol</b>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<i>L. acidophilus</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<i>L.rhamnosus</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<b>Kavun</b>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<b>Ananas</b>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<b>Enginar</b>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

S.S: standard sapma

Salami ve ark., (2010) yaptıkları bir çalışmada tripsin, kimotripsin, proteinaz K ve *Bacillus thermoproteolyticus rokko* kaynaklı termolysin ile sınırlı düzeyde hidrolize edilen deve ve inek peynir altı sularının antimikrobiyel ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, araştırmacılar özellikle deve sütünden elde edilen peynir altı suyunun hidrolizatı ve hidrolizatın 3-10 kDa arasındaki fraksiyonlarının inek sütü peynir altı suyu hidrolizatına göre *E. coli* üzerine daha yüksek antimikrobiyel aktivite sergilediğini belirlemişlerdir. Diğer taraftan, tripsin ve kimotripsin ile hidrolize edilen peynir altı suyu hidrolizatının antimikrobiyel aktivitelerinin birbirine yakın olduğunu tespit etmişlerdir. *E. coli*'ye karşı en yüksek antimikrobiyel aktivitenin ise proteinaz K ile hidrolize edilmiş ve 3 kDa büyüklüğündeki peynir altı suyu fraksiyonunda olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Osman ve ark., 2016), keçi sütü peynir altı suyunun *Bacillus licheniformis*'den elde edilen alkalaz ile hidrolizi sonucu oluşan peptitlerin antimikrobiyel aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, Peynir altı suyunun pH 7,8'de ve 55 °C'de 240 dakika hidroliz edilmesiyle elde edilen peptitlerin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

*Bacillus cereus* ATCC 33018, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ve *Escherichia coli* ATCC 8739 üzerinde antimikrobiyel etkisinin olduğu belirlenmiştir. Buna göre, araştırmacılar peynir altı suyu hidrolizatının boyut dışlama kromatografisinden (size-exclusion chromatography) elde edilen fraksiyonlarından F3 diye kodlanan fraksiyonunun yüksek derecede antimikrobiyel aktivite gösterdiğini ve bu F3 fraksiyonunun 731 ve 1833 Da moleküler büyüklüğündeki peptitlerden oluştuğunu ifade etmişlerdir. Theolier ve ark. (2013) ticari olarak satılan peynir altı suyu izolatını (Biopro) domuz pepsin A, tripsin ve kimotripsin enzimleri ile hidroliz etmişlerdir. Araştırmacılar, peynir altı suyu izolatının 1,5 saat sonunda hidroliz derecesinin domuz pepsin A, tripsin ve kimotripsin için sırasıyla ortalama %3,7, %11 ve %12 olarak bulmuşlardır. Tripsin (triptik aktivite) ve kimotripsin (kimotriptik aktivite) ile hidroliz işlemi uygulanmış peynir altı suyu izolatlarının *E. coli* ve *L. ivanovii* üzerine antimikrobiyel aktivite göstermeği, pepsin enzimi (peptik aktivite) ile hidrolize olmuş peynir altı suyu izolatının ise her iki mikroorganizmaya karşı inhibisyon gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Peptik parçalanma ile hidroliz edilmiş peynir altı suyu izolatında antimikrobiyel aktivite gösteren peptit büyüklüklerinin 1000 Da olduğu ve LC-MS/MS tanımlamalarında  $\beta$ -Igf(14–18),  $\beta$ -Igf(123–125),  $\beta$ -Igf(50–54)  $\beta$ -Igf(134–136),  $\beta$ -Igf(143–146),  $\beta$ -Igf(147–149) ve  $\alpha$ -Iaf(117–121) fragmentlerinin olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, tanımlanan fraksiyonlardan  $\beta$ -Igf(14–18),  $\beta$ -Igf(123–125) ve  $\beta$ -Igf(147–149)'in nötral pH'larda pozitif yüklenen, izoelektrik noktaları 10 pH'nın altında olan ve temel olarak bazik ve alifatik amino asitlerden oluştuğu,  $\beta$ -Igf(143–146),  $\beta$ -Igf(134–136)'ın ise yüksüz ve izoelektrik noktalarının ise 7 pH'ya yakın olduğu belirtilmiştir. Mathieu ve ark. (2013) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise peynir altı suyu izolatının tripsin (triptik aktivite) ile hidrolizi sonucunda antimikrobiyel aktiviteye sahip peptitlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Çalışmada, sığır pankreası kaynaklı tripsin IV enzimi ile hidroliz edilmiş peynir altı suyu izolatına öncelikle 10 kDa geçirim değerine sahip (cut-off) sahip ultrafiltrasyon işlemi yapılmış ve daha sonra 2,5 kDa geçirim değerine sahip nanofiltrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucu elde edilen NF-retantının *L. ivanovii* HPB28, *L. innocua* RBL29, *L. monocytogenes* Scott A3, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* MC4100 ve *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 üzere yüksek derecede antimikrobiyel etki gösterdiği bulunmuştur. Yapılan peptit tanımlama analizlerinde, NF-retantında sekiz amino asitten fazla sayıya sahip anyonik peptitlerin yüksek miktarda olduğu, yüksek antimikrobiyel etkiye sahip peptitlerin  $\beta$ -Lg'den salınan anyonik özellikteki  $\beta$ -Igf (84-91) ve  $\beta$ -Igf (125-135),

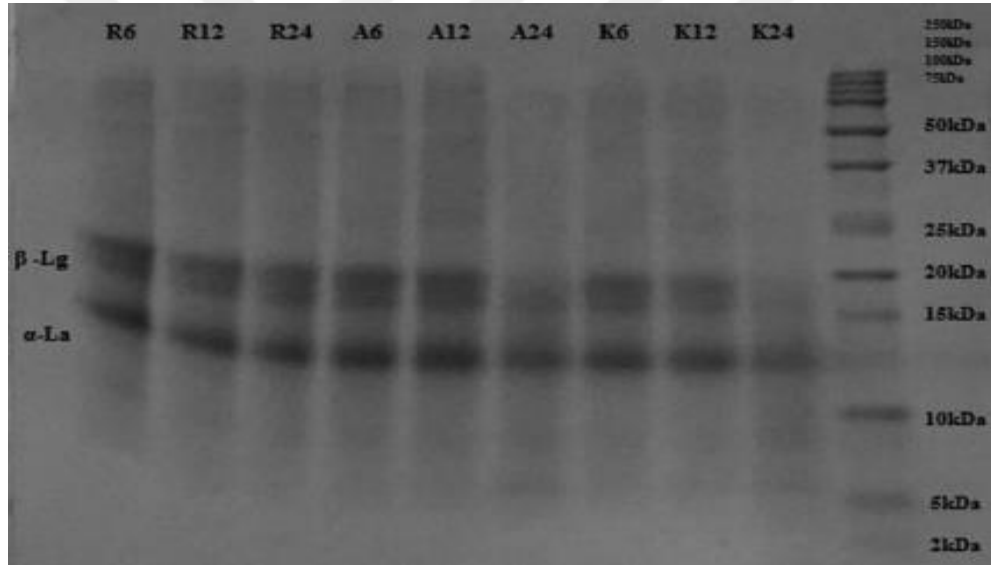
katyonik özellikteki  $\beta$ -Igf (36-42) fraksiyonlarının olduğu belirlenmiştir. Abdel-Hamid ve ark. (2016) ise papaya bitkisi kaynaklı papain enzimi ile hidrolize ettikleri deve sütü peynir altı suyunun boyut dışlama kromatografisinden elde ettikleri fraksiyonlarının antimikrobiyel aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, hidrolize olmuş deve sütü peynir altı suyu ve boyut dışlama kromatografisinden elde edilen fraksiyonların *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* üzerine hidrolize olmamış peynir altı suyundan daha fazla inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, hidrolizat ve fraksiyonlarında 414.05 Da ve 456.6 Da molekül büyüklüğüne sahip iki peptidin başlıca bulduklarını ancak söz konusu peptitlerin tanımlanmasının yapılamadığını ifade etmişlerdir. Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada (Elbarbary ve ark., 2019) ise farklı pH'larda buzağı ve mikrobiyel kaynaklı rennetlerin ve domuz pepsini enzimlerinin hidrolizi ile ham peynir altı suyundan antimikrobiyel peptitlerin hazırlanması araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, pH 3'de ve buzağı renneti ile hidrolize edilen peynir altı suyunun *Bacillus subtilis* ve *E. coli*'ye karşı en yüksek antimikrobiyel etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Peynir altı suyunun her üç enzim ile hidrolizi sonucunda oluşan antimikrobiyel peptit fraksiyonlarının laktoferrin f(20–30), ve  $\beta$ -laktoglobulin f(14–22) ve f(92–103) olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular ile literatürdeki bulgular birlikte değerlendirildiğinde, fermente ve hidrolize ettiğimiz peynir altı sularında antimikrobiyel aktivitenin belirlenmemesinin; a) ham enzim ekstraktlarındaki enzimlerin serum proteinleri ile etkileşimlerinin farklı olması, b) fermente ve hidroliz edilen peynir altı suyunun protein fraksiyonlarının tam olarak saflaştırılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, konu ile ilgili önceki çalışmalarda hidroliz süresinin çoğunlukla hidroliz edilen peynir altı sularının çoğunlukla jel filtrasyon ve boyut geçirim kromatografisiyle fraksiyonlarına ayrıldığı ve ayrılan bu fraksiyonların yüksek antimikrobiyel etki gösterdiği görülmüştür. Oluşan antimikrobiyel peptitlerin ortamda bulunan diğer bileşenlerle moleküler düzeyde etkileşime girmeleri de antimikrobiyel etkinin görülmemesine neden olmuş olabilir. Diğer taraftan, peynir altı suyunun farklı enzimatik hidroliz çalışmalarında enzim çeşitlerinin çoğunlukla 1 kDa'dan küçük antimikrobiyel peptit üretme potansiyellerinde çok fazla değişkenliğin olduğu da görülmüştür.



#### 4.7. Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının SDS-PAGE Sonuçları

Peynir altı suyuna uygulanan enzimatik hidroliz ve fermentasyon işlemlerinin proteinler üzerine etkisini görebilmek için elektroforetik analizler gerçekleştirilmiştir. Örneklerin SDS-PAGE analizleri sonucunda elde edilen jellere ait görüntüler Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’ de verilmiştir. Elektroforez jelleri incelendiğinde, örneklerin tümünde 10-20 kDa arasında olan iki ana bandın olduğu görülmektedir. Söz konusu bamlardan birincisi ~18,4 kDa moleköl büyüklüğüne sahip olan  $\beta$ -laktoglobulin, ikincisi ~14,3 kDa moleköl büyüklüğüne sahip olan  $\alpha$ -laktalbumindir (Şekil 4.2 ve 4.3). Hidroliz ve fermentasyon işleminin proteolize etkisi değerlendirildiğinde, bitkisel ham enzim ekstraktları ile hidrolizasyon işleminin probiyotik bakteriler ile fermentasyon işleminden daha yüksek protein parçalanması gerçekleştirdiği saptanmıştır.

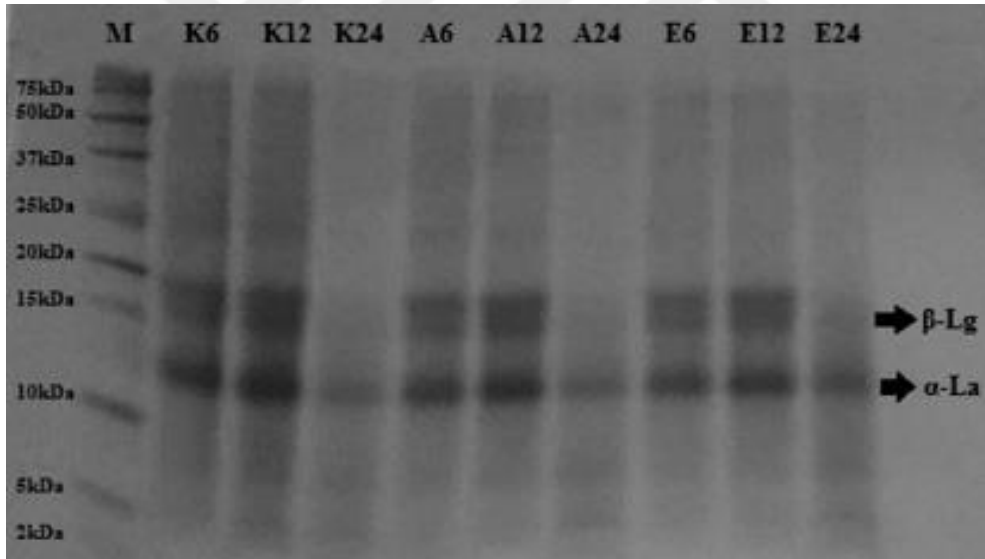


Şekil 4.2. Fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiş peynir altı suyunun elektroforez görüntüsü (R6: 6 saat *L. rhamnosus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; R12: 12 saat *L. rhamnosus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; R24: 24 saat *L. rhamnosus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; A6: 6 saat *L. acidophilus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; A12: 12 saat *L. acidophilus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; A24: 24 saat *L. acidophilus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; K6: 6 saat kontrol grubu; K12: 12 saat kontrol grubu; K24: 24 saat kontrol grubu)

Probiyotik mikroorganizmaların serum proteinleri üzerine etkisi SDS-PAGE jelleri ile değerlendirildiğinde, peynir altı suyunun her iki mikroorganizma ile 24 saat fermentasyonu sonucunda  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin bamlarının yoğunluklarının azaldığı, özellikle  $\beta$ -laktoglobulin’in bant yoğunluğu azalmasının  $\alpha$ -laktalbumin’in bant yoğunluğu azalmasından daha fazla olduğu görülmüştür. Jellerde yapılan görüntü analizi sonucunda 6-

24 saat arasında *L. rhamnosus* ve *L. acidophilus* ile fermentasyon işleminde peynir altı suyundaki  $\beta$ -laktoglobulin'in bant yoğunluğunun azalma miktarının sırasıyla ortalama %13,16 ve 34,16 olduğu,  $\alpha$ -laktalbumin'in bant yoğunluğunun azalma miktarının ise sırasıyla ortalama %7,27 ve %13,52 olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).

Hidroliz işleminin serum proteinleri üzerine etkisi SDS-PAGE jelleri ile değerlendirildiğinde ise  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin bandlarına ait yoğunlukların her ikisinde de fermentasyon süresince azaldığı tespit edilmiştir. Fermentasyon işleminde olduğu gibi yine  $\beta$ -laktoglobulin'in bant yoğunluğu azalmasının  $\alpha$ -laktalbumin bant yoğunluğu azalmasından daha fazla olduğu görülmüştür. Nitekim, jellerde yapılan görüntü analizi sonucunda 6-24 saat arasındaki hidroliz işleminde kavun, ananas ve enginar'dan elde edilen enzim ekstraktının peynir altı suyundaki  $\alpha$ -laktalbumin bant yoğunluğunun azalma miktarı sırasıyla ortalama %37,68, %54,7 ve %16,34 bulunurken  $\beta$ -laktoglobulin'in bant yoğunluğundaki azalma miktarının ise ~ %80 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş peynir altı sularının elektroforez görüntüsü (M: 250-2kDA protein standardı; K6: 6 saat boyunca kavundan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; K12: 12 saat boyunca kavundan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; K24: 24 saat boyunca kavundan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; A6: 6 saat boyunca ananastan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; A12: 12 saat boyunca ananastan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; A24: 24 saat boyunca ananastan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; E6: 6 saat boyunca enginardan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; E12: 12 saat boyunca enginardan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; E24: 24 saat boyunca enginardan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu)

Çalışmada elde edilen  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin parçalanma miktarları yapılan diğer çalışmalarla bazı benzerlik ve farklıklar göstermektedir. Buna göre; Neto ve ark., (2019) yaptıkları bir çalışmada *E. javanicum* ve *M. thermophile* ile elde ettikleri proteazların peynir altı suyu proteinlerinin hidrolizasyon miktarlarını sırasıyla %20,85 ve %20,26 olarak belirlemişlerdir. Buna karşın, Tavares ve ark. (2011) yabancı enginar ekstraktının farklı enzim/substrat oranları kullanıldığında  $\alpha$ -laktalbumin'i hidrolize etme miktarının %1,3-7,9 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Wróblewska ve ark., (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, peynir altı suyu protein izolatının alkalaz ve papain enzimleriyle iki aşamalı hidroliz edilmesiyle oluşan protein hidroliz miktarının % 15.9 olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada (Abdel-Hamid ve ark., 2016) ise deve sütü peynir altı suyu proteinlerinin papain ile 240 dakika boyunca hidroliz edilmesiyle tüm serum proteinlerinin tamamen parçalandığı tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada piyasada bulunan peynir altı suyunun, hem probiyotik bakterilerle fermente edilerek hem de bitkisel enzimlerle hidroliz edilerek besinsel yönden iyileştirilmesi/zenginleştirilmesi düşünülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen genel bulgular şu şekildedir;

1. Ananas, kavun ve enginar kabuklarından elde edilen enzim ekstraktlarının spektrofotometrik olarak belirlenen proteolitik enzim aktiviteleri sırasıyla 5,066, 4,921 ve 5,514 UI/mL enzim ekstraktı olarak belirlenmiştir. Enginar'dan elde edilen ham enzim ekstraktının proteolitik aktivitesinin diğer ekstraktlara göre daha yüksek bulunmasına rağmen bu durum SDS-PAGE analizlerinde doğrulanamamıştır. Bu durumun, analizde substrat olarak kullanılan kazein proteininden kaynaklandığı düşünülmüştür.

2. *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* ile fermente edilen peynir altı suyu örneklerinde 24 saat'lik fermentasyon sonucu her iki probiyotik bakteri sayısının 6 log kob/mL düzeyinden aşağıya düşmediği ve *L. acidophilus* sayısında ortalama 0.39 log kob/mL düzeyinde *L. rhamnosus* sayısında ise 1,09 log kob/mL düzeyinde bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir.

3. Çalışma sonucunda, peynir altı suyunun antioksidan aktivite değerlerinin hem fermentasyon hem de hidroliz işlemiyle arttığı CUPRAC ve DPPH yöntemine göre belirlenmiştir. Buna göre; ananas, enginar ve kavun kabuklarından elde edilen ham bitkisel enzim ekstraktlarıyla hidrolize olan peynir altı suyu örneklerinde ortalama %35-53 arasında değişen antioksidan aktivite artışının meydana geldiği tespit edilmiştir. Buna karşın, *L. acidophilus* ile fermente edilmiş peynir altı suyu örneklerinin antioksidan aktivite değerinde %16,20 oranında artış olduğu, fermente olmamış örnekte ise antioksidan aktivite artışının % 8,74 olduğu belirlenmiştir.

4. Antioksidan aktivite sonuçlarına benzer olarak, peynir altı suyu örneklerinin ACE inhibitör aktivitesi değerlerinin, yapılan uygulamanın çeşidine ve süresine bağlı olarak değişim gösterdiği bulunmuştur (uygulama x süre interaksyonu). Buna göre; probiyotik mikroorganizmalarla fermente edilen peynir altı suyu örneklerinin ACE inhibitör aktiviteleri ortalama 2,02-6,48 kat artarken, bitkisel enzim ekstraktları ile hidroliz edilen peynir altı suyu örnekleri ortalama 1,85 ile 3,29 kat arasında artış göstermiştir.

5. Fermente ve hidroliz edilmiş peynir altı sularının *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* bakterileri üzerine herhangi bir mikrobiyel inhibisyon sağlamadığı da tespit

edilmiştir. Bu durumun; fermentasyon/hidroliz süresince ham bitki ekstraktlarında bulunan ve mikrobiyel faaliyet sonucu ortaya çıkan enzimlerin çeşidinden kaynaklı olduğu, ayrıca fermente/hidroliz edilen peynir altı suyu proteinlerinin alt fraksiyonlarına ayrılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

6. Yapılan SDS-PAGE analizleri sonucunda; serum proteinleri olan  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin parçalanmalarının gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hidroliz ve fermentasyon işleminin proteolize etkisi değerlendirildiğinde, bitkisel ham enzim ekstraktları ile yapılan hidrolizasyon işleminin probiyotik bakteriler ile yapılan fermentasyon işleminden daha yüksek protein parçalanması gerçekleştirdiği saptanmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda;

1. Farklı bitkisel enzim kaynakları veya farklı probiyotik starter kültürler kullanılarak elde edilen peynir altı suyundan antioksidan ve ACE inhibitör özellikleri zenginleştirilmiş peynir altı suyu protein hidrolizatlarının üretilebileceği görülmüştür.

2. Fermentasyon ve enzimatik hidroliz ile elde edilen peynir altı sularının antimikrobiyel aktivitelerinin, ürünlerin proteinlerinin saflaştırılması ve alt fraksiyonlaması yapıldıktan sonra ölçülmesi gerektiği görülmüştür.

3. Biyoaktif özellikleri artırılmış hidrolize veya fermente peynir altı sularının üretiminin farklı parametreler (sıcaklık, süre, enzim/substrat miktarı vb.) göz önünde bulundurularak pilot düzeyde optimize edilmesi gerektiği görülmüştür. Ürünlerin optimize edilen şartlarda çok yönlü olarak biyoaktif özelliklerinin detaylı araştırılması ve daha sonra büyük ölçekte üretimlerinin yapılması gereklidir.

4. Hidroliz veya fermentasyon yoluyla üretilen fonksiyonel özellikleri artırılmış peynir altı suyu ürünlerinin hayvan besleme çalışmalarıyla *in vivo* olarak hücresel düzeydeki etkilerinin gelecekte yapılacak çalışmalarda ele alınmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Abdalla, M.O.M., Ali D.A.A. and B.E. Mohamed. 2010. Extraction, Milk Clotting Activity Measurements and Purification of *Solanum dubium* Fresen (Gubban) for Cheese Making. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 5 (2): 152-159.
- [2] Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., and Hamad, E. 2017. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*. 66: 91-98.
- [3] Abdel-Hamid, M., Goda, H.A., De Gobba, C., Jensen, H., Osman, A., 2016. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. *International Dairy Journal*. 61: 91-98.
- [4] Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*. 100(1): 65-75.
- [5] Ahmed, I.A.M., Morishima I., Babiker E. E., ve Mori, N., 2009. Characterisation of Partially Purified Milk-clotting Enzyme from *Solanum dubium* Fresen Seeds. *Food Chemistry*. 116 (2): 395-400.
- [6] Ahtesh, F., Stojanovska, L., Shah, N., & Mishra, V. K. (2016). Effect of Flavourzyme® on angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides formed in skim milk and whey protein concentrate during fermentation by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Food Science*, 81(1), M135-M143.
- [7] Akar, B., Öner, M. D., 1994. İncir sütünün saflaştırılması ve Antep peyniri yapımına uygulanması. *Gıda*.19 (5): 329-331.
- [8] Akhtar, M., 2017.  $\beta$ -Casomorphin: an opioid bioactive peptide in bovine milk have impact on human health. *Gomal University Journal of Research*. 33(1).
- [9] Anantharaman, K., Finot, P.A., 1993. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. *Food Rev Int*. 9: 629-655.
- [10] Anonim, 1995. TSE 11860, Ankara.
- [11] Anonim, 2018. Mikroorganizmalardan enzim üretimi. Web sitesi: <https://www.foodelphi.com/tag/enzim-cesitleri/> Erişim tarihi: 19/09/2018

- [12] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. 2004. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: The CUPRAC method. *J Agric Food Chemistry*: 52:7970-7981.
- [13] Bargeman, G., Dohmen-Speelmans, M., Recio, I., Timmer, M., Van Der Horst, C., 2000. *Selective Isplation of Cationic Amino Acids and Peptides by Electro-Membrane Filtration*. *Lait*. 80: 175-185.
- [14] Barać, M., Pešić, M., Vučić, T., Vasić, M., & Smiljanić, M., 2017. *White cheeses as a potential source of bioactive peptides*. *Mljekarstvo/Dairy*. 67(1).
- [15] Barros, R. M., Ferreira, C. A., Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2001). Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8-9), 541-547.
- [16] Benvenuti, S., Pellati F., Melegari, M., Bertelli, D., 2004. *Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia*. *Journal of Food Science* 69: 164–169.
- [17] Bilgin, B., Dağlıoğlu, O. ve Konyalı, M., 2006: *Functionality of bread made with pasteurized whey and/or butter*. *Ital. J. Food Science* 3(18): 277-286.
- [18] Boye, J.I., Ma, C.Y., Harwalkar, V. R., 1997. *Thermal denaturation and coagulation of proteins*. In: *Food Proteins and Their Applications*, Danodaran S (Ed), Marcel Dekker Inc, New York, USA. 25-56.
- [19] Bozacı, E., Öktem T. ve Seventekin N., 2007. "*Ananas Yaprak Lifi*", *Tekstil & Konfeksiyon*, cilt 3, pp. 167-170.
- [20] Bradley, J R L, Arnold J E, Barbano D M, Semerad R G, Smith D E and Vines B K (1992): *Chemical and physical methods*. In *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, pp 433–531. Marshal R T, ed. Washington, DC: American Public Health Association
- [21] Brandelli, A., Daroit, D.J., Correa, A.P.F., 2015. *Whey as a source of peptides with remarkable biological activites*. *Food Research International*. 73:149-161.
- [22] Bryant, C.M., McClements, D.J., 1998. *Molecular basis of protein functionality with special considetation of cold-set gels derived from heat-denatured whey*. *Food Science and Technology*. 9:143-151.
- [23] Büyüktuncel, E., 2013. *Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler*. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 17: 93-103.

- [24] Carvalho, L. M., Fernandes F. M. ve Zabel S., 2009. "*The Collection of Pineapple Fibers-Ananas Comosus (Bromeliaceae)-at the Harvard University Herbaria*", Harvard Papers in Botany, cilt 14, no. 2, pp. 105-109.
- [25] Castro, W. F., Cruz, A. G., Bisinotto, M. S., Guerreiro, L. M. R., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A., Cunha, R. L. & Deliza, R. 2013. *Development of Probiotic Dairy Beverages: Rheological Properties and Application of Mathematical Models in Sensory Evaluation*. Journal of Dairy Science. 96:16-25.
- [26] Chazarra, S., L. Sidrach, D. Lopez-Molina ve J.N. Rodríguez-López., 2007. *Characterization of the Milk-Clotting Properties of Extracts from Artichoke (Cynara scolymus L.) Flowers*. International Dairy Journal. 17(12):1393-1400.
- [27] Chabance, B., Marteau P., Rambaud J.C., Migliore Samour, D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jollès, P. ve Fait A. M., 1998. *Casein Peptide Release and Passage to the in Humans During Digestion of Milk or Yogurt*. Biochimie. 80: 155-65.
- [28] Chavan, R., Shraddha, R., Kumar, A. & Nalawade, T., 2015. *Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications*. Journal of Food Processing and Technology. 6:1-8.
- [29] Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2014). Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. Food microbiology, 42, 117-121.
- [30] Chen, Y., Li, C., Wue, J., Kwok, L., Yang, J., Zhang, H., Menghe B., 2015. *Characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk produced by Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Science. 98 (8): 5113-5124.
- [31] Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Garcia-Gonzalo, D., Pagan, R., Laglaoui, A., 2013. Chemical composition and antioxidant properties of Laurus nobilis L. and Myrtus communis L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. Journal Science Food Agriculture. 94(6):1197-1204.
- [32] Child, J.L., Droke, M. A., 2010. Consumer Perception of Astringency in Clear Acidic Whey Protein Beverages. Journal of Food Science. Volume 75, Issue 9, 513-521.
- [33] Clare, D. A., Swaisgood, H. E., 2000. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus (Invited Review). Journal Dairy Science. 83: 1187-1195.
- [34] Correa, A.P.F, Daroit, D.J., Fontoura, R., Meira, S.M.M., Segalin, J., Brandelli, A., 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. Peptides. 61: 48-55.



- [35] Corrons, M.A., Bertucci, J.I., Liggieri, C.S., López, L.M.I. and Bruno, M.A., 2012 Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *Food Science and Technology*. 47:103-109.
- [36] Costa, E.L., Gontijo, J.A.R., and Netto F.M., 2007. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*. 17:632-640.
- [37] Cushman, D.W., Cheung, H.S., 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 7 (20): 1637-1648.
- [38] Çardak, A.D., 2014. Peynir üretiminde bitkisel proteaz kullanımı. 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu. 17-19 Nisan 2014, Adana. 517 s.
- [39] Dalir, E. B. M., Lee, B. H., & Oh, D. H., 2018. Current trends and perspectives of bioactive peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*. 58(13): 2273-2284.
- [40] Dave, R.I., Shah, N.P., 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*, *Journal of Dairy Science*. 79(9): 1529-1536.
- [41] De Vuyst, L., 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*. 38:105–112.
- [42] Devi, L. U., Bhagawan S. ve Thomas S., 1997. "Mechanical Properties of Pineapple Leaf Fiber- Reinforced Polyester Composites", *Journal of Applied Polymer Science*. 64(9):1739- 1748.
- [43] Dinçoğlu, A., Ardiç, M., 2012. “Peynir Altı Suyunun Beslenmemizdeki Önemi ve Kullanım Olanakları”, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (1), 54-60. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/huvfd/issue/29574/317259>
- [44] Djurić, M., Carić, M., Milanović, S., Tekić, M. and Panić, M., 2004. Development of Whey-Based Beverages. *European Food Research and Technology*. 219:321-328.
- [45] Donagh, D. Mc., Lawless, F., Gardiner, G. E., Ross, R. P., Stanton, C., Donnelly, W. J., 1999. *Milk and Dairy Products for Better Human Health*. Teagasc, Publications, NDC 199 (Via <http://www.teagasc.ie/publications/ndc1999/paper8.htm>).
- [46] Duarte, A.R., D. M. R. Duarte, K.A. Moreira, M.T.H. Cavalcanti, J.L. Lima-Filho and A.L.F. Porto., 2009. *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze a New Vegetable Source for Milk-Clotting Enzymes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52 (1): 1-9.

- [47] Egito, A.S., J.M. Girardet, L.E. Laguna, C. Poirson, D. Molle, L. Micloc, G. Humbert and J. L. Gaillard., 2007. Milk-Clotting Activity of Enzyme Extracts from Sunflower and Albizia Seeds and Specific Hydrolysis of Bovine  $\kappa$ -Casein. *International Dairy Journal*. 17 (7): 816– 825.
- [48] Elbarbary, H.A., Ejima, A., Sato, K., 2019. Generation of antibacterial peptides from crude cheese whey using pepsin and rennet enzymes at various pH conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99:555-563.
- [49] Esposito, M., Di Pierro, P., Dejonghe, W., Mariniello, L., Porta, R., 2016. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*. 204:115-121.
- [50] Esteves, C.L., A. Luceya, B.D. Hyslopa ve E.M. Piresb., 2003. *Effect of Gelation Temperature on the Properties of Skim Milk Gels Made from Plant Coagulants and Chymosin*. *International Dairy Journal*. 13 (11): 877–885.
- [51] Eyigör, H., Selcuk, O. T., Eren, E., Yilmaz, M. D., Osman, U., 2015. *Anjiyoödem, ACE-Inhibitör Kullanımına Bağlı*. Angioedema Due to use of ACE-Inhibitor).
- [52] Fao, 2010. *Faostat Statical Databases* [<http://faostat.fao.org>] Erişim Tarihi: 20.05.2019
- [53] Fersht, A., 1998. *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman and Company, USA
- [54] Finot, P.A., 1997. *Effects of processing and storage on the nutritional value of food proteins*. In: *Food Proteins and Their Applications*, Danodaran S (Ed), Marcel Dekker Inc, New York, USA. 551-578.
- [55] Fitsimons, S. M., Mulvihill, D. M., Morris, E. R., 2007. *Denaturation and Aggregation Process in Thermal Gelation of Whey Proteins Resolved by Differential Scanning Calorimetry*. *Food Hydrocolloids*. 21 (4): 638-644.
- [56] Gill, H. S., Rutherford, K. J., 1998. *Immunomodulatory Properties of Bovine Milk*. *Bulletin of IDF*. 336: 31-35.
- [57] Guo, Y., Jiang, X., Xiong, B., Zhang, T., Zeng, X., Wu, Z., Sun, Y., Pan, D., 2019. *Production and transepithelial transportation of Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)- inhibitory peptides from whey protein hydrolyzed by immobilized Lactobacillus helveticus proteinase*. *Journal Dairy Science*. 102:1–15
- [58] Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2010. *Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri*. *Akademik Gıda*. 8 (1): 23-31.

- [59] Hamme, V., Sannier, F., Piot, J.M., Didelot, S., Juchereau, S.B., 2009. *Crude goat whey fermentation by Kluyveromyces marxianus and Lactobacillus rhamnosus: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity*. Journal of Dairy Research. 76:152–157.
- [60] Hakkak, R., Korourian, S., Ronis, M.J., Johnston, J.M. and Badger, T.M., 2001: *Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.10: 555-558.
- [61] Haque, E., and Chand, R., 2008. *Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins*. European Food Research and Technology. 227(1): 7-15.
- [62] Haque, E., Chand, R., and Kapila, S., 2008. *Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin*. Food Reviews International. 25(1): 28-43.
- [63] Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., & Recio, I., 2007. *Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin*. International Dairy Journal. 17(1): 42-49.
- [64] Hoerr, R. A., Bostwick, E. F., 2000. *Bioactive Proteins and Probiotic Bacteria: Modulators of Nutritional Health*. Nutrition. 16 (7-8): 711-713.
- [65] Ibrahim, H.R., Ahmed, A.S., Miyata T., 2017. *Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from casein and whey proteins of goat milk*. Journal of Advanced Research. 8: 63-71.
- [66] İnal, T. ve Ergün, Ö., 1990: *Süt ve Süt Ürünleri Teknolojisi*. Panzehir Kitapevi Yayınları, İstanbul.
- [67] Jacob, M., Jaros, D., Rohm., H., 2011. *Recent Advances in Milk Clotting Enzymes*. International Journal of Dairy Technology. 64 (1): 14–33.
- [68] Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, L., 2008. *Whey-based beverages -a new generation of dairy products*. Mljekars tvo. 58 (3): 257-274.
- [69] Kailasapathy, K., Harmstorf, L., Phillips, M., 2008. *Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis spp lactics in stirred fruit yogurts*, LWT Food Science and Technology. 41:7.
- [70] Kancabaş, A., 2010. “*Geleneksel Fermente Bir İçecek Olan Bozanın Angiotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) İnhibisyon Üzerine Etkisi*”. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir. 9-10.
- [71] Kaur, J., Kumar, V., Sharma, K., Kaur, S., Gat, Y., Goyal, A., & Tanwar, B., 2019. *Opioid peptides: an overview of functional significance*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 1-9.

- [72] Kınık, Ö. ve Gürsoy, O., 2002. *Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler*. Mühendislik Bilimleri Dergisi. 8 (2): 195-203.
- [73] Kırca, A., Özkan, Ö. 2010. *Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri*. Gıda analizleri, editör. Bekir Cemeroğlu, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Yayın No: 34, bizim Grup Basımevi, Ankara.
- [74] Konrad, B., Anna, D., Marek, S., Marta, P., Aleksandra, Z., Jo'zefa, C., 2014. *The Evaluation of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV,  $\alpha$ -Glucosidase and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Whey Proteins Hydrolyzed with Serine Protease Isolated from Asian Pumpkin (*Cucurbita ficifolia*)*. Int. Journal Pept. Res. Ther. 20:483–491.
- [75] Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Ranramaki, P., Tupasela, T., 1998. *Impact of processing on bioactive proteins and peptides*. Trends in Food Science and Technology. 9: 307-319.
- [76] Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., 2000. Milk Protein-Derived Bioactive Peptides- Novel Opportunities for Health Promotion. Bulletin of IDF. 363: 17-26.
- [77] Korhonen, H., and Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal. 16 (9): 945-960.
- [78] Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods. 1 (2): 177-187.
- [79] Kurt, A. ve Gülümser, S., 1988: Peynir suyu ve kullanım imkanları. Gıda dergisi. 2 (3):133-141.
- [80] Lacroix, I.M.E., Meng, G., Cheung, I.W.Y., Li-Chan, E.C.Y., 2016. Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? Journal of Functional Foods. 21: 87–96
- [81] LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdez, J. C., LeBlanc, J., & Perdigon, G. (2002). Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Science, 85(11), 2733-2742.
- [82] Ledesma, B.H., Davalos, A., Bartolome, B., Amigo, L., 2005. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from r-Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53:588-593.
- [83] Lestari, P. ve Suyata, S., 2019. "Antibacterial activity of hydrolysate protein from Etawa goat milk hydrolysed by crude extract bromelain". 13th Joint Conference on Chemistry. Indonesia. 509.

- [84] Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2010). Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of dairy science*, 93(2), 437-455.
- [85] Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., Sarkar, P., 2019. Bioactive Peptides from Whey Proteins. National Dairy Research Institute. India. 519-537.
- [86] Mathieu, V.D., Gauthier, S.F., Britten, M., Fliss, I, Robitaille, G., Jean, J., 2013. *Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration*. *International Dairy Journal*. 28: 94-101.
- [87] Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutierrez, T.C., Lugo-Sanchez M.E., Ramirez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., Gonzales-Cordova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., 2013. *Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts*. *Food Chemistry*. 141: 1902-1907.
- [88] M. A. Mazorra-Manzano, J. C. Ramírez-Suarez & R. Y. Yada (2018) Plant proteases for bioactive peptides release: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:13, 2147-2163, DOI:10.1080/10408398.2017.1308312
- [89] McIntosh, G.H., Royle, P.J., Le Leu, R.K., Regester, G.O., Johnson, M.A., Grinsted, R.L., Kenward, R.S., Smithers, G.W., 1998. *Whey proteins as functional food ingredients*. *Int. Dairy Journal*. 8: 425-434.
- [90] Vera Medeiros, Nuno Rainha, Lisete Paiva, Elisabete Lima & José Baptista (2014) Bovine Milk Formula Based on Partial Hydrolysis of Caseins by Bromelain Enzyme: Better Digestibility and Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Properties, *International Journal of Food Properties*, 17:4, 806-817, DOI: 10.1080/10942912.2012.675607
- [91] Meisel, H., 1997. *Biochemical Properties of Regulatory Peptides Derived from Milk Proteins*. *Biopolymers*. 43 (2): 119-128.
- [92] Meisel, H. ve Bockelmann, W., 1999. *Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76 (1-4): 207-215.
- [93] Metin, M., 1983. *Süt Sanayisinde Peynir Suyunun Değerlendirilmesi*. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Dergisi. 1(1): 151-169.
- [94] Metin, M., 1998. *Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi*. Ege Üniv. Müh. Fak. Yay. No: 33.

- [95] Mohamed, A., Sapuan S., Shahjahan M. ve Khalina A., 2010. "*Effects of Simple Abrasive Combing and Pretreatments on the Properties of Pineapple Leaf Fibers (Palf) and Palf-Vinyl Ester Composite Adhesion*", Polymer-Plastics Technology and Engineering. 49 (10): 972-978.
- [96] Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, P.K., Pattnaik, R., Mohapatra, S., Saini, M.R., 2016. *Milk Derived Antimicrobial Bioactive Peptides: A Review*. International Journal of Food Properties. 19 (4):837-846.
- [97] Neto, Y.A.A.H., Rosa, J.C., Cabral, H., 2019. *Peptides with antioxidant properties identified from casein, whey, and egg albumin hydrolysates generated by two novel fungal proteases*. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 49 (7):639-648.
- [98] Osman, A., Goda, H.A., Abdel-Hamid, M., Badran, S.M., Otte, J., 2016. *Antibacterial peptides generated by alcalase hydrolysis of goat whey*. Food Science and Technology. 65:480-486.
- [99] Pala, M., 1997: *Functional foods: Present and future perspectives*. 38. Uluslararası Gıda Kongresi Kitapçığı. Kuşadası, Aydın.
- [100] Papenburg, R., Bounous, G., Fleiszer, D. ve Gold, P., 1990: *Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy*. Tumor Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 11: 129-136.
- [101] Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P., 2001. *Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine L-lactoglobulin*. Biochimica et Biophysica Acta. 1526: 131-140.
- [102] Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. ve Villani, F., 2004. *Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics*. Meat Science. 67: 309-317.
- [103] Pereira de Souza, A.M., Bezerra de Farias, D.R., Brito de Queiroz, B., Suelleny de Caldas Nobre, M., Cavalcanti, M.T., Salles, H.O., Olbrich dos Santos, K.M., Dantas de Medeiros, A.C., Florentino, E.R., Buriti, F.C.A., 2019. *Influence of a Co-culture of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus casei on the Proteolysis and ACE-Inhibitory Activity of a Beverage Based on Reconstituted Goat Whey Powder*. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 11:273–282.
- [104] Pérez, Y.A., Urista, C.M., Cerda, A.M., Sánchez, J.Á., Rodríguez, F.R., 2019. *Antihypertensive and Antioxidant Properties from Whey Protein Hydrolysates Produced by Encapsulated Bacillus subtilis Cells*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 25:681–689.

- [105] Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., de Valdez, G.F. 2008. *Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content*. Food Microbiology. 3 (25): 442-451.
- [106] Pihlanto-Leppälä, A., 2001. *Bioactive Peptides Derived from Bovine Whey Proteins: Opioid and Ace-Inhibitory Peptides*. Trends in Food Sci. and Technology. 11: 347-356.
- [107] Pihlanto, A. ve Korhonen, H., 2003. *Bioactive Peptides and Proteins*. Advances Food and Nutrition Research. 47: 175- 276.
- [108] Prados, F., A. Pino and J. Fernández-Salguero., 2007. *Effect of a Powdered Vegetable Coagulant from Cynara cardunculus in the Accelerated Ripening of Manchego Cheese*. International Journal of Food Science and Technology. 42 (5): 556-561.
- [109] Preuffer, M., Schrezenmeir, J., 2000. *Bioactive Substances in milk with properties decreasing risk of cardiovascular Disease*. The British Journal of Nutrition. 84 (1): 155-159.
- [110] Rocha, G.F., Kise, F., Rosso, A.M., Parisi., M.G., 2017. *Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from Salpichroa organifolia fruits*. Food Chemistry. 237:350-355.
- [111] Roseiro, L.B., M. Barbosa, J.M. Ames and R.A. Wilbey., 2003. *Cheesemaking with Vegetable Coagulants—the use of Cynara L. for the Production of Ovine Milk Cheeses*. International Journal of Dairy Technology. 56 (2): 76-85.
- [112] Russ, W. and Meyer-Pittroff, R., 2004. *Utilizing Waste Products from The Food Production and Processing Industries*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 44: 57-62.
- [113] Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A., & Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. International Dairy Journal, 11(4-7), 441-447.
- [114] Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. Food chemistry, 156, 264-270.
- [115] Salami, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Ehsani, M.R., Yousefi, R., Haertle, T., Chobert, J.M., Razavi, S.H., Henrich, R., Balalaie, S., Ebadi, S.A., Pourtakdoost, S., Naslaji, A.N., 2010. *Improvement of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Camel and Bovine Whey Proteins by Limited Proteolysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58:3297–3302.

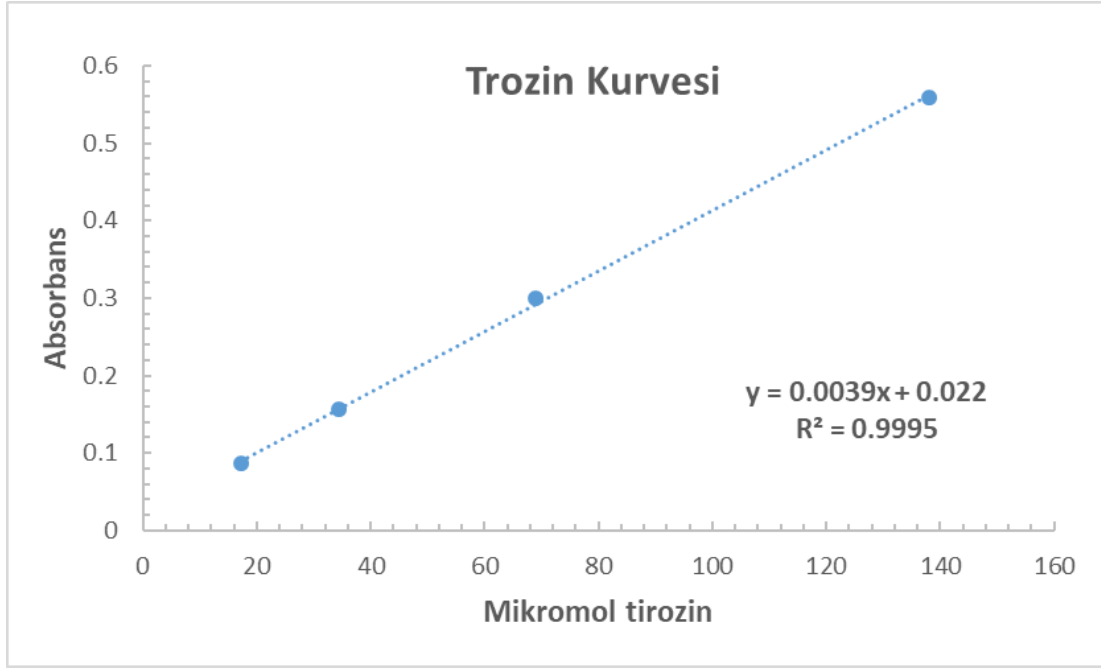
- [116] Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., 2019. *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*. Institute of Agroindustry. Technological University of the Mixteca. Mexico. 1-20.
- [117] Say, D., Soltani, M., Güzeler, N., 2012. *Süt ürünlerinde kullanılan bitkiler*. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu.10-12 Mayıs. Konya. 390-391.
- [118] Say, D., Güzeler, N., 2016. *Süt pıhtılaştırılmasında kullanılan bazı bitkiler*. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı: 253-261.
- [119] Schrezenmeier, J., De Vrese, M., 2001. *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics Approaching a Definition*. American Journal of Clinical Nutrition. 73 (2): 361-364.
- [120] Sharma, S., Singh, R., Rana, S., 2011. *Bioactive peptides: a review*. Int. Journal Bioautomation. 15(4):223–250.
- [121] Sheskin, D.J., 2004. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*. 3rd edn, pp 1193. New York: Chapman and Hall/CRC press.
- [122] Silvestre, M.P.C., Morais, H.A., Silva, V.D.M., Silva, M.R., 2013. *Whey as a source of peptides with high antioxidant activity: use of pancreatin and aspergillus sojae protease*. Journal of Food Science and Technology. 52 (1):143-147.
- [123] Şahan, N., Konar, A., 1990. *Peynir üretiminde sütü pıhtılaştırmada kullanılan proteolitik enzimler*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 5(4): 129-140.
- [124] Şalk, A., Arın, L., Deveci, M. ve Polat, S., 2008. *Özel Sebzeçilik*. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü. Tekirdağ. 488.
- [125] Tavares, T. G., Monteiro, K. M., Possenti, A., Pintado, M. E., Carvalho, J. E., & Malcata, F. X. (2011). Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. International Dairy Journal, 21(12), 934-939.
- [126] Tavares, T.G., Contreras, M.M, Amorim, M., Martin-Alvarez, P.J., Pintado, M.E., Recio, I., Malcata, F.X., 2011. *Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract*. International Dairy Journal. 21:926-933.
- [127] Tejada, L., A. Abellán, J.M. Cayuela and A. Martínez-Cacha., 2006. *Sensorial Characteristics During Ripening of the Murcia Al Vino Goat's Milk Cheese: The Effect of the Type of Coagulant Used and The Size of the Cheese*. Journal of Sensory Studies. 21 (3):333-347.



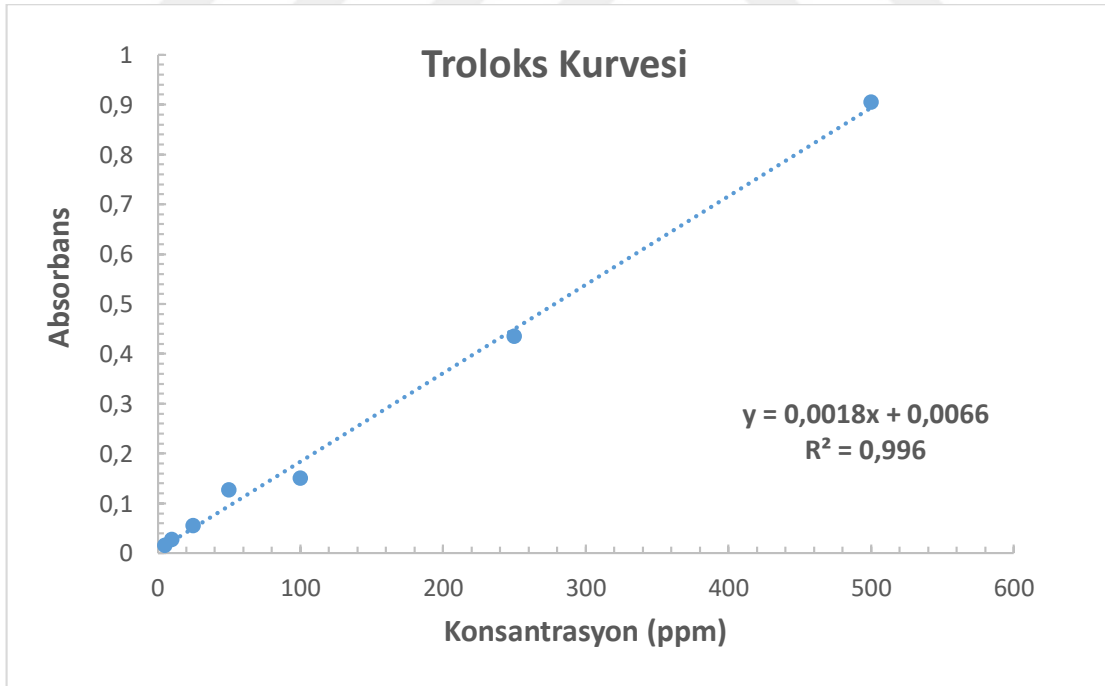
- [128] Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., Jean, J., 2013. *Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate*. Journal of Functional Foods. 5: 706-714.
- [129] Tirelli, A., De Noni, I., Resmini, P., 1997. *Bioactive Peptides in Milk Products*. Ital. Journal Food Science. 9 (2):91-98.
- [130] Tome, D., Ledoux, N., 1998. *Nutritional and Physiological Role of Milk Protein Components*. Bulletin of IDF 336: 11-16.
- [131] Trivedi, M.S., Hodgson, N.W., Walker, S.J., Trooskens, G., Nair, V., Deth, R.C., 2015. Epigenetic effects of casein-derived opioid peptides in SHSY5Y human neuroblastoma cells. Nutr Metab. 12:54.
- [132] Tsai, J. S., Chen, T. J., Pan, B. S., Gong, S. D., & Chung, M. Y., 2008. *Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk*. Food Chemistry. 106(2): 552-558.
- [133] Tsakali, E., Petrotos, K. D' Alessandro, A. Goulas, P., 2011. *A Review on Whey Composition and the Methods Used for Its Utilization for Food and Pharmaceutical Products*.<http://www.fabe.gr/images/stories/SYNEDRIA/8.pdf>
- [134] Üçüncü, M., 1991: *Beslenme Peynir Suyunun Önemi*. Ege Üniv. Gıda Müh. Teksiri. Bornova, İzmir.
- [135] Üçüncü, M., 2005: *Süt ve Mamulleri Teknolojisi*. Metabazım. Bornova, İzmir.
- [136] Villadóniga, C., Macció, L., Cantera, A.M.B., 2018. *Acid whey proteolysis to produce angiotensin-1 converting enzyme inhibitory hydrolysate*. Environmental Sustainability. 1:267–278
- [137] Vinderola, C. G.; Reinheimer, J. A., 2003. *Lactic acid bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*. Food Research International. 36: 895–904.
- [138] Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H., 2007. *Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria*. Journal of Applied Microbiology. 1 (102): 1364-5072.
- [139] Welsh, G., Ryder, K., Brewster, J., Walker, C., Mros, S., Bekhit, A. E. D. A., ... & Carne, A., 2017. Comparison of bioactive peptides prepared from sheep cheese whey using a food-grade bacterial and a fungal protease preparation. International Journal of Food Science and Technology. 52(5):1252-1259.
- [140] Wróblewska, B., Troszyńska, A., 2005. *Enzymatic hydrolysis of cow's whey milk proteins in the aspect of their utilization for the production of hypoallergenic formulas*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 14 (55): 349–357.

- [141] Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T., 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal Dairy Science*. 77: 917-922.
- [142] Yeaman, M. R., Yount, N. Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*. 55(1): 27-55.
- [143] Yerlikaya, O., Kınık, Ö., Akbulut, N., 2010. Peynir altı Suyunun Fonksiyonel Özellikleri ve Peynir altı Suyu Olarak Kullanılarak Üretilen Yeni Nesil Süt Ürünleri. *Gıda*. 35 (4): 289-296.
- [144] Yerlikaya, O., Akpınar, A., Torunoğlu, F. A., Kınık, Ö. Akbulut, N. Uysal, H., 2012. Effect of Some Prebiotic Combination on Viability of Probiotic Bacteria in Reconstituted Whey and Milk Beverages. *Agro Food Industry Hi Technology*. Online Erişim <http://www.researchgate.net/publication/276264594>.
- [145] Yetişemiyen, A., 2007. *Süt Teknolojisi*. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara. 142.
- [146] Yusof, Y., Yahya S. A. ve Adam A., 2015. "Novel Technology for Sustainable Pineapple Leaf Fibers Productions", *Procedia CIRP*. 26: 756- 760.

## EKLER



Ek 1. Proteolitik aktivitenin tayininde kullanılan tirozin kurvesi



Ek 2. CUPRAC antioksidan tayininde kullanılan troloks kurvesi

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TAŞ, Atilla  
Uyruğu : T.C.  
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.10.1980 - Ereğli / Konya  
Medeni Hali : Bekar  
e-mail : [atillatas42@hotmail.com](mailto:atillatas42@hotmail.com)

### Eğitim

#### Derece Eğitim Birimi Mezuniyet Tarihi

Yüksek Lisans	Uşak Üniversitesi/Müh. Fak. / Gıda Mühendisliği	Günümüz
Lisans	Mersin Üniversitesi/Müh. Fak. / Gıda Mühendisliği	2005
Lisans	Anadolu Üniversitesi/İktisat Fak. / İktisat	2012
Ön Lisans	Anadolu Üniversitesi/Açık Öğretim Fak. / Adalet	2017
Lise	Konya Ereğli Lisesi / Fen-Fen Bilimleri	1997

### İş Deneyimi

#### Yıl / Yer / Görev

2015-Halen	Uşak Süt A.Ş	İşletme Müdürü
2013-2015	Enka Süt A.Ş	İşletme Müdürü
2011-2013	Yörsan Gıda A.Ş	ArGE Şefi
2005-2011	Torunoğlu Süt A.Ş	Üretim / Kalite Güvence Müdürü

### Hobiler

Kitap okumak, futbol oynamak, halk oyunları oynamak, seyahat etmek, spor yapmak